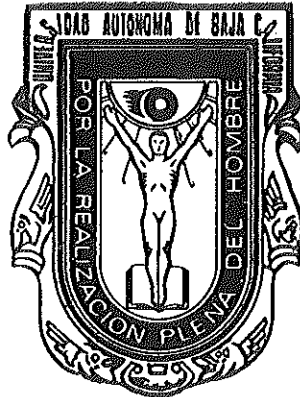


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS



"LA ALMEJA Corbicula fluminea (Müller, 1774)  
COMO ORGANISMO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA  
DE AMBIENTES DULCEACUÍCOLAS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL  
GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

EN MANEJO DE ECOSISTEMAS  
DE ZONAS ÁRIDAS

P R E S E N T A

Hugo Silva Kurumiya

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

"LA ALMEJA Corbicula fluminea (Müller, 1774)  
COMO ORGANISMO EXPERIMENTAL EN TOXICOLOGÍA  
DE AMBIENTES DULCEACUÍCOLAS"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

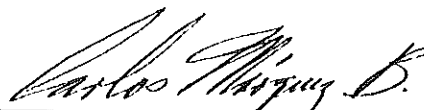
MAESTRO EN CIENCIAS

EN MANEJO DE ECOSISTEMAS DE ZONAS ÁRIDAS

PRESENTA

Hugo Silva Kurumiya

APROBADO POR:

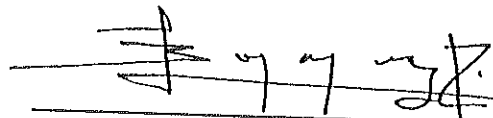


Dr. Carlos Márquez Becerra  
Presidente del Jurado  
(Director de Tesis)



Dr. Gorgonio Ruíz Campos

Sinodal



MC Guillermo Bojórquez Rangel

Sinodal

Ensenada, Baja California, México.

Marzo de 1997.

## DEDICATORIA

A la memoria de mí Madre,  
Hortensia Kurumiya Valenzuela,

Y con todo respeto a mí Padre,  
Alvaro G. Silva Espinoza,

Y para mis hermanos y sobrinos,  
Alvaro, Alicia, Patricia, Fernando, Hortencia,  
Armando, Xavier, Alvaro, Fernando, Alejandro.

Con todo respeto y cariño , para Tuly ,  
por ser un importante aliciente para lograr  
la culminación de esta meta y,  
para la búsqueda de otras más ...

## AGRADECIMIENTOS

Deseo externar mí agradecimiento al Dr. Carlos Márquez Becerra, por el apoyo brindado durante mis estudios de posgrado; por su valiosa asesoría durante el desarrollo de la tesis, ya que sus comentarios y apreciaciones fueron importantes para esclarecer y disipar dudas durante las distintas etapas que requirió el tema de tesis y sobre lo que debe seguir después de la conclusión del mismo.

A la M.C. Sara Ojeda Benitez, del Instituto de Ingeniería de la Univ. Autón. De Baja Calif., ya que su apoyo fue fundamental para lograr concluir el tema de tesis y por lo tanto mis estudios de maestría.

Al Dr. Margarito Quintero Núñez, Director del Instituto de Ingeniería de la Univ. Autón. de Baja Calif. por su apoyo y confianza durante el desarrollo del texto de la presente tesis.

Al Dr. Gorgonio Ruíz Campos, por la asesoría en la cuestión estadística, así como de la interpretación de los datos. Además, por sus acertadas críticas a la tesis, las cuales han ayudado a esclarecer el texto de la misma.

Al M.C. Cesar Valenzuela Solano, por su disposición a ayudar y por haber aceptado ser parte de mí comité, a pesar de su carga académica en el extranjero.

Al M.C. Guillermo Bojórquez Rangel, del Centro de Estudios Biológicos, de la Univ. Autón. de Cd. Juárez, por aceptar ser parte de mi comité y por el profesionalismo mostrado como revisor.

Al Dr. Victor Salceda Sacanelles, del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, por su disposición a ayudar como investigador y amigo; así como en su momento, como Coordinador del Comité de Estudios de Posgrado de nuestra Facultad de Ciencias y, por no olvidar que es parte de mi comité de tesis.

Un merecido agradecimiento a la Facultad de Ciencias, UABC, por proporcionar toda la infraestructura necesaria para culminar mis estudios de posgrado.

También, un agradecimiento para los Amigos que de una u otra manera han participado, en su momento, como importantes voluntarios durante el desarrollo de la tesis.

Así también, para mis compañeros de generación de quienes también e aprendido: Ana, Rosy, Isabel, Martha, Mary, Beto, Alfredo, Jorge.

A los técnicos laboratorista, Lucy, Socorro, Eva, Cecy, y en especial a Alejandro Mancera. También para las secretarías, Blanca, Lulú, Bertha, Nohemí, Mayra y Claudia.

A todos ellos ;gracias! ...

## RECONOCIMIENTO

El presente trabajo de tesis, se desarrolló en los Laboratorios de Genética y de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, Univ. Autón. de Baja California. Dentro del proyecto central : "DETECCIÓN DE AGENTES MUTAGENICOS EN LAS COSTAS DE BAJA CALIFORNIA" , el cual es dirigido por el Dr. Carlos Márquez Becerra. También durante el desarrollo del tema de tesis se utilizó equipo adquirido con ayuda del Fondo para Modernizar la Educación Superior (FOMES) dentro del proyecto "CONSOLIDACIÓN DE UN LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA USOS MÚLTIPLES" en el periodo 95-96, y durante su continuación en el periodo 96-97.

Un especial agradecimiento para el CONACyT, ya que gracias a la beca-crédito otorgada (Núm. de Registro 66745) pude iniciar y concluir mis estudios de maestría.

Para las siguientes personas también deseo expresar un merecido agradecimiento, ya que con su ayuda pude resolver varios imponderables:

M.C. Miguel H. Carrillo M

LCC. Martha Estrada

LCC. Mary Cervantes

Sr. Ramón Buruel

## RESUMEN

Las almejas del género Corbicula habitan en ambientes dulceacuícolas y estuarinos. Se distribuyen en el sureste de Asia, India, África, Europa y en América. La especie Corbicula fluminea (Müller, 1774) se recolectó por primera vez en América en 1924, en Vancouver, Columbia Británica, Canadá. Se supone que desde ahí empezó la colonización de Norteamérica, de tal forma que, en 1952 se localizaron especímenes en el sur de California, Estados Unidos de América y posteriormente en Baja California, México. Sus poblaciones son abundantes y están estructuradas con numerosos especímenes de todas las tallas; son de fácil acceso, muy resistentes al manejo y transportación y se pueden mantener en acuarios fácilmente. En este trabajo, se presentan los resultados de diversas etapas experimentales en las que se ha explorado la posibilidad de emplear a Corbicula en estudios de toxicología, entre las que destacan los siguientes: cultivo de branquias, efectos del fungicida benomil en los cilios de branquias in vitro, efectos de concentración letal media (CL<sub>50</sub>). También se ensayó con la colchicina como control positivo y se realizaron varios experimentos comparativos con el mejillón Mytilus californianus (Conrad, 1837). Se observó que las branquias cultivadas en medio de Benex de Corbicula responden de manera similar a las del mejillón. Sin embargo cuando se exponen a colchicina la respuesta es distinta, por ejemplo, a una concentración de 0.5%, la almeja Corbicula se comporta más tolerante que el mejillón hasta las 8 h, pero a mayores tiempos su deterioro es más rápido. El fungicida benomil afecta a los cilios de ambas especies de bivalvos de forma semejante a la colchicina, a 2.56 ng/ml empieza el deterioro a las 18h en Corbicula en tanto en Mytilus el declinamiento ocurre a las 2 h. En dichos experimentos la almeja fue más resistente. Cabe destacar que la toxicidad del benomil se demuestra fácilmente en los experimentos in vitro con ambas especies, no obstante cuando se aplica in vivo se requieren concentraciones hasta 100 veces más altas para causar la muerte a más del 50% de los individuos en plazos de 3 días. La mortalidad es masiva a los 6 días.

## ÍNDICE

CONTENIDO	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
II.1. Plaguicidas	9
II.2. Fungicidas	13
II.3. Fungicidas sistémicos	18
II.4. Aspectos de la evaluación de la toxicidad	21
II.4.1. Clasificación de los agentes tóxicos	26
II.4.2. Definición de toxicidad, peligro y riesgo	26
II.4.3. Prioridades en la selección de sustancias que se someterán a prueba	28
II.5. Microtúbulos	29
II.6. Cilios	31
II.7. Generalidades de la almeja <u>Corbicula fluminea</u>	34
II.7.1. Distribución geográfica	34
II.7.2. Taxonomía	35
II.7.3. Ciclo de vida	35
II.7.4. Hábitat	37
III. OBJETIVO	39
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	40
IV.1. Área de estudio	40
IV.1.1. Localización	41
IV.1.2. Clima	42
IV.1.3. Fisiografía	42
IV.1.4. Hidrología	43
IV.1.5. Vegetación	45
IV.2. Selección de la especie que se utilizó	46

IV.3. Ubicación de la zona de estudio y tiempo de recolección	46
IV.4. Condiciones de manejo de los organismos	48
IV.5. Cultivo de branquias	50
IV.6. Evaluación de los cultivos	52
IV.7. Diferentes temperaturas en el cultivo de branquias	54
IV.8. Diferentes niveles de pH en el cultivo de branquias	56
IV.9. Concentración letal media (CL <sub>50</sub> ) del benomil en almeja <u>Corbicula fluminea</u>	56
IV.10. Análisis de datos	57
V. RESULTADOS	58
V.1. Efectos de temperaturas en el cultivo de branquias de la almeja <u>Corbicula fluminea</u>	58
V.2. Efectos de diferentes niveles de pH en el cultivo de branquias de la almeja <u>Corbicula fluminea</u>	60
V.3. Efectos de la toxicidad de la colchicina en el cultivo de branquias de la almeja <u>Corbicula fluminea</u> y el mejillón <u>Mytilus californianus</u>	62
V.4. Efectos de la toxicidad del benomil en el cultivo de branquias de la almeja <u>Corbicula fluminea</u> y el mejillón <u>Mytilus californianus</u>	66
V.5. Concentración letal media (CL <sub>50</sub> ) del benomil en almeja <u>Corbicula fluminea</u>	70
VI. DISCUSION	73
VII. CONCLUSIONES	78
VIII. BIBLIOGRAFÍA	80

## Lista de Figuras

Contenido	Pag.
Fig. 1 Ubicación de la zona de recolección de la almeja <u>Corbicula fluminea</u> en la Cd. de Mexicali, B.C.	47
Fig. 2 Ubicación de la zona de recolección del mejillón <u>Mytilus californianus</u> en la Bahía de Ensenada, B.C.	49
Fig. 3 Se observa el comportamiento del cultivo de branquias de la almeja <u>Corbicula fluminea</u> a diferentes temperaturas. La actividad ciliar y la calidad del cultivo permanece sin modificaciones hasta las 24 horas.	59
Fig. 4 Se muestra el comportamiento del cultivo de branquias de la almeja <u>Corbicula fluminea</u> durante 24h en presencia de distintos niveles de pH. El cultivo y la actividad ciliar permanece sin modificaciones dentro una escala de pH 6 hasta pH 9.	61
Fig. 5 Se muestra el comportamiento del cultivo de branquias de la almeja <u>Corbicula fluminea</u> hasta las 72h, en presencia de varias concentraciones de colchicina.	63
Fig. 6 Se muestra el comportamiento del cultivo de branquias del mejillón <u>Mytilus californianus</u> hasta las 12h, en presencia de varias concentraciones de colchicina. Se observa que desde el inicio del cultivo el deterioro es evidente.	65
Fig. 7 Se muestran los efectos del benomil en el	

cultivo de branquias de la almeja Corbicula. En el experimento a 48 horas, se observa un deterioro dependiente de la concentración.

67

Fig. 8 Se muestran los efectos del benomil en el cultivo de branquias del mejillón Mytilus. Se observa que el mejillón es más sensible al benomil ya que el daño es mayor en menor tiempo.

69

Fig. 9 Se indican los porcentajes de sobrevivencia de la almeja Corbicula durante 6 días de exposición a distintas concentraciones de benomil. A una concentración de 500 µg/ml se observa una mortalidad media elevada a las 72 h.

71

## Lista de Tablas

	Contenido	Pag.
Tabla I	Clasificación de los plaguicidas según la plaga que atacan.	12
Tabla II	Fungicidas más utilizados en México.	16
Tabla III	Sistemas biológicos utilizados en pruebas toxicológicas.	22
Tabla IV	Pruebas más frecuentes utilizadas en toxicología experimental.	24
Tabla V	Pruebas de toxicidad y sus principales objetivos.	25
Tabla VI	Ubicación taxonómica de <u>Corbicula fluminea</u> .	36
Tabla VII	Constituyentes del medio de Benex.	51
Tabla VIII	Resumen del sistema de evaluación propuesto para el cultivo de branquias	53
Tabla IX	Características que se evaluaron en el cultivo de branquias.	55

## INTRODUCCIÓN

La contaminación por sustancias xenobióticas potencialmente tóxicas, constituye una preocupación a nivel mundial por los riesgos que conlleva para la salud y para los ecosistemas. Así, la acumulación de sustancias contaminantes en el ambiente aumenta la probabilidad de la exposición del humano a éstas, durante algún periodo de su vida incluyendo la gestación (Vega y Reynaga, 1990).

Se han desarrollado métodos analíticos de alta sensibilidad para detectar y cuantificar la presencia en el ambiente de cantidades mínimas de sustancias potencialmente tóxicas. Sin embargo, los datos obtenidos de estas mediciones han sobrepasado la capacidad para determinar el significado biológico que resulta de la exposición a los mismos.

En la investigación toxicológica de agentes nocivos, se utilizan diversos sistemas biológicos para realizar las pruebas de determinación, para lo cual se ensaya en ADN, virus, bacterias y hongos, pasando por invertebrados y mamíferos. La utilización de varios de estos sistemas de prueba presenta algunos inconvenientes; dado que resulta oneroso el aplicarlas, al tener la necesidad de utilizar instalaciones y equipos apropiados y quizás el mayor inconveniente radique en la gran cantidad de tiempo que debe transcurrir para obtener resultados.

Es una práctica común en los estudios toxicológicos, la utilización de organismos centinelas o indicadores de contaminación; sin embargo, en la mayoría se evalúa el tipo y/o cantidad de sustancias contaminantes que el o los organismos seleccionados han incorporado en sus tejidos por medio de la absorción o ingesta de los mismos; sin evaluar realmente si el contaminante incorporado al organismo está provocando un efecto adverso en su desarrollo o ciclo vital.

Dentro de los organismos centinelas, el grupo de los bivalvos ha sido ampliamente utilizado en estudios de contaminación por metales pesados y pesticidas, entre

otros. La aceptación de estos organismos como centinelas, se basa en la actividad filtradora que desarrollan y, en la capacidad de acumulación de sustancias extrañas en sus cuerpos. Debido a estas características de filtración y bioacumulación, se han desarrollado importantes programas de monitoreo de contaminantes en ambientes acuáticos, utilizando mejillones, ostiones y almejas.

Sin embargo, es importante hacer incapié que el hecho de cuantificar y/o cualificar la presencia de contaminantes, no brinda información sobre el daño que esté ocasionando, o que pudiese generar en el organismo. En el presente trabajo de tesis se experimentó con el cultivo branquias de dos especies de bivalvos: la almeja Corbicula fluminea (Müller, 1774) y el mejillón Mytilus californianus (Conrad, 1837) como sistemas de prueba in vitro; para la detección y evaluación de los efectos citotóxicos provocados por sustancias xenobióticas. Además se utilizó a la almeja Corbicula fluminea para evaluar la posible utilización en estudios toxicológicos de Concentración Letal.

Durante la realización de los experimentos se utilizaron dos sustancias: la primer sustancia fué

colchicina, conocida por su capacidad para inhibir la formación del huso mitótico en las células y, la segunda fue el benomil o benlate, un fungicida de amplio espectro, que según el fabricante sólo inhibe la formación de microtúbulos en hongos.

## **ANTECEDENTES**

Actualmente, el acelerado desarrollo industrial ha provocado la presencia de sustancias que por sus características o por su alta concentración, son dañinos tanto para los organismos como para los ambientes en donde éstas se desarrollan. Estas sustancias o agentes nocivos provocan alteraciones en la estructura y función de los organismos expuestos, las que se manifiestan como incapacidades, enfermedades, muertes y hasta desaparición de especies animales y vegetales; así como en el desequilibrio de la dinámica natural de los ecosistemas (Ariéns, et al., 1978; Fernícola y Jauge, 1985; Albert y Molina, 1988b; Vega y Reynaga, 1990; Albert y Alpuche, 1990).

Como consecuencia de esta problemática, se han realizado grandes esfuerzos para promover la investigación de los riesgos toxicológicos derivados de la exposición a

contaminantes ambientales (Ariëns, et al., 1978; Cortinas et al., 1984, 1985; Fernícola y Jauge, 1985).

A la fecha, se han logrado avances en el conocimiento de los efectos indeseables de numerosos contaminantes en la salud humana provocados por la exposición, sobretodo en el ambiente laboral. Sin embargo, la incertidumbre que prevalece con respecto al riesgo, es decir, a la probabilidad de ocurrencia de un efecto tóxico particular derivado de la exposición a contaminantes ambientales, es extremadamente grande (Albert y Molina, 1988b; Vega y Reynaga, 1990; Albert y Alpuche, 1990).

Por tanto, es importante impulsar en pleno el desarrollo y la aplicación de sistemas de prueba novedosos, que permitan avanzar con rapidez en el conocimiento de la cinética de los contaminantes dentro de los organismos vivos, de los mecanismos de acción toxicológica y sobretodo de la respuesta de los individuos a sus efectos (Vega y Reynaga, 1990; Mathew y Menon, 1992).

Hasta hace unos años, la toxicología era una ciencia descriptiva de los factores nocivos agudos de sustancias poco utilizadas en el ámbito general. Actualmente es generadora de conocimientos para definir cuanto es lo máximo aceptable de las sustancias a las que con relativa

frecuencia se expone el ser humano. Además se han realizado importantes avances en la comprensión de los mecanismos fisiológicos, celulares y moleculares que determinan la toxicidad. Asimismo, define los riesgos de una exposición prolongada a las sustancias potencialmente tóxicas, más allá de lo previamente conocido sobre el riesgo por una exposición intensa y de corta duración (Ariëns, et al., 1978; OPS-OMS, 1980; Vega y Reynaga, 1990; Alia, et al., 1992).

Este tipo de conocimientos permite sugerir la prohibición o disminución en el uso o producción de ciertas sustancias, el control de aquellas con un bajo riesgo, así como determinar el posible papel de estos tóxicos en el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas y de respuestas mutagénicas, carcinogénicas y teratogénicas (Nagao y Sugimura, 1978; Cortinas et al., 1984, 1985, 1988; Vega y Reynaga, 1990 y Alia et al., 1992).

En la actualidad se pueden detectar más de 100,000 tipos de sustancias contaminantes del ambiente. Estas pueden ser naturales o bien producto de la actividad humana. Sin embargo, la concentración de estas sustancias contaminantes en cada región terrestre, está condicionada

por las características biogeoquímicas y socioeconómicas que en ellas prevalecen (Fernícola y Jauge, 1985; Albert y Molina, 1988a; Vega y Reynaga, 1990).

Aunque en el ambiente es muy complicado determinar el movimiento de las sustancias; aún así, es importante determinar la cinética de un contaminante a través del aire, agua, tierra y biota. Así como el de sus posibles interacciones y modificaciones en cada uno de estos ámbitos. Puesto que cuando un contaminante es incorporado al ambiente, se dispersa en el medio correspondiente e interactúa con los elementos pertenecientes a él, se transporta a ciertas distancias dentro de ese medio y se transfiere hacia otros. Además en cualesquiera de estos pasos el contaminante se puede transformar y degradar (Fernícola y Jauge, 1985; Albert y Molina, 1988a; Vega y Reynaga, 1990; Albert y Alpuche, 1990; Ferrando et al., 1992).

En la etapa de experimentación del presente trabajo se aplicó el fungicida denominado benomil, por lo que se presenta a continuación información relativa a pesticidas y se hace énfasis en los fungicidas.

## II.1. PLAGUICIDAS.

Se entiende por plaguicida a cualquier sustancia o mezcla de sustancias con la cual se pretenda prevenir, repeler, destruir o atenuar una plaga. A su vez, se entiende por plaga a cualquier organismo que interfiera con la conveniencia o bienestar del hombre u otra especie de su interés (Vega y Reynaga, 1990; Loera y Albert, 1990a, 1990b; Albert y Alpuche, 1990; Ferrando et al., 1992).

Desde hace por lo menos 2 décadas, los estudiosos del problema alimentario han demostrado que la producción mundial de alimentos ha sido más que suficiente para satisfacer los requerimientos nutricionales de toda la población. No obstante, por problemas de distribución, especulación, almacenamiento y transporte va a dar a la basura aproximadamente el 40% de dicha producción (Restrepo, 1992).

Mientras los países industrializados han incrementado sus cosechas gracias a métodos intensivos y nuevas tecnologías, los demás se estancan, o peor aún, retroceden. Así, desde hace tiempo urge a los países pobres o en vías de desarrollo aumentar los rendimientos en numerosos cultivos. Esto ha conducido, entre otras cosas, a la progresiva adopción en el sector agrícola de los sistemas

de cultivo que dieron origen a la revolución verde. Para lograr altos rendimientos, no sólo se ha mejorado la tecnología; también han incrementado las áreas de riego e intensificado el empleo de fertilizantes. La modernización de la agricultura, implicó igualmente un incremento en el uso de los plaguicidas. Empero, el empleo de estos compuestos químicos para el control de plagas causa impactos negativos al ambiente y la salud (Restrepo, 1992).

Como respuesta a las necesidades que surgieron de estos cambios, la creciente industria química lanzó al mercado, a muy bajo costo, una serie de sustancias de toxicidad inespecífica para combatir las plagas (Cremllyn, 1992).

En el mundo se emplean diariamente cantidades enormes de numerosos plaguicidas con el propósito de combatir y eliminar diversas plagas y enfermedades consideradas como dañinas para el hombre y los cultivos agrícolas. En los últimos 20 años casi se triplicó la producción y aplicación de dichas sustancias hasta sumar hoy más de 4 millones de toneladas (Restrepo, 1992).

Pero como la mayoría de los plaguicidas son un peligro para la salud y el ambiente; su producción y aplicación son un problema de suma importancia. Se calcula (para 1992) en

50 millones el número de personas expuestas a un uso intensivo de plaguicidas. Otros 500 millones, a uno menos intenso, pero hasta más peligroso, pues saben poco o de plano ignoran los riesgos que corren al elaborar, distribuir y aplicarlos en la agricultura, al consumir alimentos que tienen residuos tóxicos; incluso, al deshacerse de los recipientes ya vacíos sin ningún cuidado (Loera, 1990; Loera et al., 1990; Pomares, 1990; Restrepo, 1992).

Los plaguicidas son agroquímicos diseñados para combatir las diversas plagas que atacan los cultivos agrícolas. Se clasifican en tres grupos principales: insecticidas, fungicidas y herbicidas; y además existen los nematocidas, molusquicidas, acaricidas y muchos otros más (Tabla I) (Loera, 1990; Cremllyn, 1992).

Los plaguicidas también se pueden dividir en dos grandes grupos: los plaguicidas de contacto o no sistémico, y los plaguicidas sistémicos. Los de contacto o de superficie no penetran notablemente en los tejidos del sistema vascular de la planta. Los primeros fungicidas fueron de este tipo y una de sus desventajas era que no resistían las inclemencias del clima (viento, lluvia y sol) durante mucho tiempo y la otra, que al crecer la planta,

Tabla I. Clasificación de los plaguicidas según la plaga que atacan (Tomado de Loera, 1990b).

---

<u>PLAGUICIDA</u>	<u>ATACA A:</u>
Fungicida	Hongos
Herbicidas	Malezas
Nematicida	Nemátodos
Molusquicida	Moluscos
Acaricida	Ácaros
Insecticida	Insectos
Ovicida	Huevecillos
Rodenticida	Roedores

---

las partes nuevas estaban desprotegidas y por lo tanto, expuestas al ataque de insectos y hongos. Los primeros plaguicidas sólo eran fungicidas protectores; en otras palabras, estaban diseñados para prevenir el desarrollo de las esporas fungales, pero, una vez que se establecía el hongo y la infección comenzaba a expandirse a través de los tejidos de la planta, la acción destructora de los fungicidas no sistémicos era muy pequeña y por lo regular no podían detener la infección (Cremlyn, 1992).

## **II.2. FUNGICIDAS.**

De las aproximadamente 100,000 enfermedades conocidas de las plantas, cerca de 8 mil son provocadas por los hongos; los que afectan a las plantas por invasión de los micelios en todas sus células. Los micelios le substraen los nutrimentos necesarios y/o producen toxinas. Además, los hongos pudren el follaje, alteran las raíces, provocan disfunción del sistema vascular y destruyen la parte comestible de las plantas. Muchas especies de hongos se desarrollan sobre la madera y varios productos textiles, de los cuales se alimentan deteriorándolos al mismo tiempo (Alpuche, 1990b; Cremlyn, 1992).

No es de extrañarse que los primeros pesticidas fueron los no sistémicos, pues son relativamente fáciles de

descubrir, ya que en el caso de ellos, la fitotoxicidad no representa tanto problema como en el de los plaguicidas sistémicos, donde el producto químico está en contacto íntimo con los tejidos de la planta huésped (Alpuche, 1990a; Cremlyn, 1992).

Se considera que un fungicida es eficaz si satisface la mayoría de las siguientes condiciones: ser de baja fitotoxicidad, ser fungitóxico por si mismo o tener capacidad de serlo dentro de la espora fungosa antes de que esta penetre a la planta, tener capacidad de penetrar a la espora y alcanzar el sitio principal de acción y sobretodo, la de adherirse firmemente a la planta y resistir así los embates del clima (Alpuche, 1990b).

Actualmente la toxicidad selectiva del fungicida es el problema más difícil de resolver, ya que la relación planta-hongo es muy estrecha, de hecho, no existe en el mercado un fungicida que sea completamente no fitotóxico (Alpuche, 1990b; Cremlyn, 1992).

Se piensa que la solución sería encontrar un fungicida que sólo interfiera en la síntesis de la quitina, sustancia que está presente en la pared celular de la mayoría de los hongos parásitos y no se encuentra en las plantas superiores (Alpuche, 1990b; Cremlyn, 1992).

Con base en el periodo de aplicación respecto a la infección que provocan y a su movilidad en los tejidos de las plantas, los fungicidas que se emplean para controlar la fungosis de las plantas se clasifican en tres grupos: de protección, los que protegen contra infecciones probables en el sitio de aplicación; de erradicación, que actúan contra una fungosis ya establecida en el sitio de aplicación y sistémicos, que evitan el desarrollo de enfermedades fúngicas en regiones de la planta lejanas al sitio de aplicación (Alpuche, 1990b).

Los fungicidas siguen en importancia a los insecticidas y herbicidas por las cantidades aplicadas actualmente en todo el mundo. Se emplean principalmente en la protección de vegetales, fruta, madera, y artículos textiles; también se emplean en los bosques, industria de construcción, en la industria papelera, en la elaboración de pinturas y barnices para prevenir y en muchos otros usos (Alpuche, 1990b).

En 1976 estaban en uso cerca de 40 fungicidas orgánicos u organometálicos, que se utilizaban principalmente para las cosechas de alto valor, como café, tabaco, cítricos, hule y plátano, y otros similares (Tabla II). La introducción de los fungicidas sistémicos (en

Tabla II. Fungicidas mas utilizados en México (Tomado de Restrepo, 1992).

---

Acetato Fenil Mercúrico	Myclobutanil
Anilazina	Oleato cúprico
Azufre elemental	Oxadixil
Benomilo	Oxicarboxin
Benzisotlazolin	Oxicloruro de cobre
Bitertanol	Oxitetraciclina
Captofol	Pencycuron
Captan	Pentaclorofenato de sodio
Carbendazin	Pentaclorofenol
Carboxin	Pirazofos
Clorotalonil	Propamocarb clorhidrato
Cloruro de Benzalconio	Propiconazole
Dimetil-tetrahidro- tiadiazina	Propionato-de-difenil- mercúrico-amonio
Dinocap	Propianato fenil mercurico
Ditio benzametil amida	Quintozeno = PCNB
Ditiocarbamatos de sodio	Sulfato de tetramin cúprico
Dodemorf	Sulfato tribásico de cobre
Edifenfos	TCMTB
Estreptomycinas	Tebuconazole
Etridiazol	Tetracloro-metil-sulfonil- piridina
Folpet	Thiram
Fosetil-al	Tiabendazol
Hidróxido cúprico	Triadimenol
Iprodiona	Triclorofenato de potasio
Isotiazqlin	Tridemorf
Mancozes	Triforine
Maneb	Vinclozolin
Metalaxil	Zineb

---

particular los carbamatos derivados del bencimidazol, como el benomil) dió al principio resultados espectaculares en algunas fungosis (Alpuche, 1990b). Sin embargo, tal como ocurre en plaguicidas de otros tipos, la lucha contra los hongos ha culminado con el desarrollo de resistencia a fungicidas (Rankin et al., 1977; Alpuche, 1990b; Cremlyn, 1992).

Como es de esperarse, muchos fungicidas presentan efectos adversos en el ambiente, ya que contaminan los suelos, cuerpos de agua y la biota terrestre, cuando se aplican directa y deliberadamente o se precipitan de la atmósfera, como consecuencia de las aspersiones aéreas. Los efectos en el suelo y la biota pueden persistir desde unos días hasta años y ser reversibles (a excepción de los fungicidas organometálicos y el benomil) (Alpuche, 1990b,c; Vega y Reynaga 1990).

Los principales efectos que se presentan después de la aplicación de un fungicida en el suelo, son cambios en la composición de las comunidades, efectos adversos sobre los organismos nitrificantes y sobre las algas, así como desarrollo de resistencia en los hongos (Leynaud, 1979; Alpuche, 1990b; Albert, 1990; Loera 1990a; Cremlyn, 1992).

Los fungicidas no sólo afectan al hongo sino que muchas veces también son muy tóxicos para la planta; además pueden interactuar con otros plaguicidas y afectar a las plantas. Algunos fungicidas y sobretodo los sistémicos reducen el número de artrópodos del suelo, así como el de las lombrices de tierra, como los tiofanatos y el benomil; otros son muy tóxicos para peces, anfibios y aves (Leynaud, 1979; Alpuche, 1990b; Pramod et al., 1993).

### **II.3. FUNGICIDAS SISTÉMICOS.**

La idea del control de las enfermedades de las plantas por medio de un tratamiento interno no es nueva, pero solamente en los últimos 25 años, es cuando han llegado al mercado los fungicidas sistémicos comercialmente viables.

Un fungicida sistémico es un compuesto que es tomado por la planta y transferido a su interior, protegiéndola de un ataque por hongos patógenos o limitando una infección. Si un producto químico a de ser considerado como fungicida sistémico efectivo, deberá satisfacer los siguientes criterios:

- a) Debe ser fungicida por sí mismo, o ser convertido en un fungicida activo dentro de la planta hospedera. Algunos compuestos parecen actuar

modificando la resistencia de la planta hospedera al ataque fungoso.

b) Debe poseer una fitotoxicidad muy baja. Este requerimiento es especialmente importante con un fungicida sistémico, ya que el producto químico es puesto en estrecho contacto con la planta hospedera.

c) Debe ser absorbido por las raíces, las semillas o las hojas, y entonces ser transferido al menos localmente, al interior de la planta. Para casi todos los propósitos comerciales, el compuesto deberá aplicarse como rociador foliar o en recubrimiento de semillas.

Los primeros fungicidas protectores o de superficie, aplicados como rociados al follaje, formaban depósitos secos sobre las hojas de la planta hospedera, protegiéndola así de un ataque por hongos; pero como es de esperarse, estos depósitos son removidos gradualmente por los efectos climatológicos y no pueden proteger los nuevos brotes de la planta formados después del rociado, ni alguna parte que no fue cubierta por el rocío. Este tipo de desventajas pueden ser superadas con el uso de fungicidas sistémicos, ya que al penetrar la cutícula de la planta, ofrecen también la posibilidad de controlar una infección fungosa ya establecida (Alpuche, 1990b; Cremlyn, 1992).

La acción fúngica sistémica se ha demostrado en muchos compuestos: sulfonamidas, antibióticos, oxatiinas,

pirimidinas y bencimidazoles. En un principio su descubrimiento tuvo poco impacto en el control a gran escala de las enfermedades fungosas; ya que eran productos muy caros y no eran suficientemente activos en condiciones de campo y causaban daños por fitotoxicidad (Alpuche, 1990c; Cremlyn, 1992).

Los compuestos representativos del grupo de los bencimidazoles, son el benomil y el tiabendazol. Ambos son fungicidas sistémicos de amplio espectro (el benomil, fue introducido en 1967, fue sintetizado a partir de la cinamida y cloroformato de metilo), son activos contra muchos hongos patógenos, incluyendo los mildiús polvosos y los patógenos del suelo. El benomil es el compuesto más activo de este grupo y su empleo generalmente es como rociador foliar, en el recubrimiento de semillas o directamente en el suelo para el control de los hongos y otras enfermedades típicas (Alpuche, 1990c; Cremlyn, 1992).

La fungitoxicidad de este producto está asociada con la presencia del anillo del bencimidazol, el cual probablemente sea responsable de la acción fungicida. Ya que en solución acuosa el benomil se hidroliza rápidamente para dar carbamato de metil-2-bencimidazol, el cual es un fungicida muy potente y quizá el principio fungitóxico

activo, ya que las propiedades fungicidas del benomil aumentan después de permanecer en un medio acuoso (Rankin, et al., 1977; Alpuche, 1990b,c; Cremlyn, 1992).

En animales de experimentación se ha comprobado que los bencimidazoles tienen efectos embriotóxicos, gonadotóxicos y teratogénicos, ya que los descendientes de los animales expuestos a ellos presentan paladar hendido y anormalidades en el desarrollo ocular y craneal (Alpuche, 1990b; Albert, 1990, Pramod et al., 1993).

#### **II.4. ASPECTOS DE LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD**

En los ensayos o pruebas para evaluar la toxicidad de las sustancias potencialmente nocivas o que se sospecha que lo son, se utilizan diferentes sistemas biológicos para su realización (Tabla III).

En general, las pruebas son realizadas en ADN, virus, bacterias, hongos, plantas, insectos, células de mamífero, mamíferos y humanos (Cortinas, et al., 1985).

Asimismo, en las pruebas toxicológicas se establecen consideraciones como el tipo de especie, las cepas y el número de los animales donde se observó el efecto tóxico; el número y tipo de tejidos y órganos afectados (Tabla IV); la dosificación, el tipo de exposición (Tabla V) (Vega y Reynaga, 1990).

Tabla III. Sistemas biológicos utilizados en pruebas toxicológicas (Tomado de Cortinas et al., 1985).

Sistema biológico	Duración aproximada de la prueba
ADN	2 - 3 días
Virus	2 - 3 días
Bacterias	3 - 5 días
Hongos	1 - 3 semanas
Plantas	1 - 5 semanas
Insectos	2 - 7 semanas
Células de mamífero	2 - 5 semanas
Mamíferos	2 - 7 meses
Humanos	1 - 2 semanas 1 - 2 días años

El problema mas difícil, en el manejo de los datos obtenidos en experimentos con animales, es la extrapolación de los resultados al hombre, debido principalmente a los problemas de conversión de una especie a otra.

En este trabajo de tesis se realizaron pruebas de toxicidad in vitro e in vivo. Las pruebas de toxicidad in vitro se ensayaron en las branquias de dos especies de bivalvos las cuales se emplearon bajo el criterio de órgano blanco con la finalidad de evaluar los efectos citotóxicos de dos sustancias (colchicina y benomil).

El fundamento del empleo de la branquia como órgano blanco, se basa en la observación del tejido que la constituye, el epitelio ciliar. Dicho epitelio posee células ciliadas y en los cilios existen microtúbulos formados por moléculas de tubulina, las cuales se encuentran ensambladas entre si. El trabajo se realiza bajo el supuesto de que los agentes tóxicos actuarán sobre la tubulina (de manera inhibitoria o estabilizadora) presentando los cilios alteraciones en su actividad o en su forma.

Los microtúbulos son organelos citoplasmáticos presentes en todas las células animales y vegetales. Debido

Tabla IV. Pruebas más frecuentes utilizadas en toxicología experimental (Tomado de Vega y Reynaga, 1990).

Tipos de pruebas toxicológicas	Propósito de la prueba	Técnicas
Pruebas farmacológicas rutinarias	efectos funcionales, incluye efectos secundarios	<u>in vivo</u> <u>in vitro</u>
Pruebas de irritación local	Efecos sobre membranas y mucosas	<u>in vivo</u>
Subagudas-crónicas	Determinan órganos blanco de la acción toxica y la relación dosis-respuesta	<u>in vivo</u>
Teratológicas	Efectos sobre la organógenesis	<u>in vivo</u>
Perinatales y posnatales	Efectos sobre la embrio-génesis tardía y posnatal temprano	<u>in vivo</u>
Pruebas de fertilidad	Efectos sobre la maduración de las células germinales y sobre el apareamiento	<u>in vivo</u>
Mutagénicas	Predecir riesgo genético y posible carcinogenicidad	<u>in vivo</u> <u>in vitro</u>
Carcinogénicas	Detectar carcinógenos	<u>in vivo</u>

Tabla V. Pruebas de toxicidad y sus principales objetivos (Tomado de Vega y Reynaga, 1990).

PRUEBAS	OBJETIVOS
Toxicidad aguda	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Determinar la Dosis Letal 50.</li> <li>- Determinar las manifestaciones clínicas y patológicas de la intoxicación aguda.</li> </ul>
Biotransformación y toxicocinética	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Determinar cualitativamente la interacción entre el "tóxico" y el organismo.</li> <li>- Determinar la variación en la respuesta al tóxico, entre una o varias especies animales.</li> <li>- Definir las características farmacocinéticas de la sustancia tóxica: absorción, distribución y eliminación.</li> </ul>
Toxicidad genética	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Demostrar cualitativamente la presencia o ausencia de actividad mutagénica o carcinogénica.</li> <li>- Servir de guía para la evaluación y cuantificación del riesgo genético humano.</li> <li>- Determinar el efecto a varios regímenes de dosificación.</li> <li>- Demostrar efectos reproductivos y teratogénicos.</li> <li>- Desarrollar datos que puedan sustentar la evaluación del riesgo reproductivo para el humano.</li> </ul>
Toxicidad crónica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Encontrar y caracterizar los efectos tóxicos que sólo se manifiestan después de una exposición prolongada, en particular los efectos irreversibles y progresivos.</li> <li>- Desarrollar datos que relacionados con los obtenidos en los estudios de biotransformación y toxicocinética sirvan para evaluar el riesgo de daños que se manifiestan tardíamente.</li> </ul>

a la importancia tanto de los cilios como los microtúbulos, se da una breve descripción mas adelante.

#### **II.4.1. CLASIFICACIÓN DE LOS AGENTES TÓXICOS.**

Cualquier agente capaz de producir una respuesta adversa en un sistema biológico se denomina agente tóxico. Estos agentes pueden ser formas de energía, como calor y radiaciones, toxinas vegetales, como algunos alcaloides, o productos sintéticos (xenobióticos), como medicamentos o plaguicidas. Pueden clasificarse de diferentes maneras: a) por su origen: en naturales o sintéticos; y los naturales, a su vez en minerales, animales y vegetales; b) por sus efectos: corrosivos, irritantes, neurotóxicos; c) por su estado físico: en sólidos, líquidos y gases (Bárcenas y Albert, 1990; Loera, 1990).

También pueden clasificarse por su naturaleza química, por su uso, por el órgano que afectan y por su mecanismo de acción. Además, cada tóxico puede pertenecer simultáneamente a dos o más clasificaciones (Bárcenas y Albert, 1990).

#### **II.4.2. DEFINICIÓN DE TOXICIDAD, PELIGRO Y RIESGO.**

En un sentido general podría decirse que la toxicidad de una sustancia es su capacidad para causar una

lesión a un organismo vivo; por lo tanto, una sustancia muy tóxica causará daño a un organismo si se le administra en cantidades pequeñas; una sustancia de baja toxicidad sólo producirá efecto cuando la cantidad sea elevada.

En consecuencia, no se puede definir la toxicidad sin hacer referencia a la cantidad de sustancia administrada o absorbida (dosis), la vía de administración de esa cantidad (por ejemplo inhalación, ingestión o inyección) y su distribución en el tiempo (por ejemplo dosis única o dosis repetidas), el tipo y gravedad de la lesión, y el tiempo necesario para producirla (OPS-OMS, 1980).

Aunque no existe una definición generalmente aceptada del "peligro" vinculado a una sustancia, el término se usa para indicar la probabilidad de que una sustancia cause un efecto adverso sobre la salud (lesión química) en las condiciones en las cuales se elabora o utiliza.

La estimación de riesgo se puede expresar en terminos absolutos o relativos. El riesgo absoluto es el riesgo excesivo debido a la exposición. El riesgo relativo, es la relación entre el riesgo en la población expuesta y el riesgo en la población sin exposición (OPS-OMS, 1980).

#### II.4.3. PRIORIDADES EN LA SELECCIÓN DE SUSTANCIAS QUE SE SOMETERÁN A PRUEBA.

En principio, todas las sustancias nuevas se deben someter a una evaluación de seguridad antes de su fabricación y venta; sin embargo, debido al gran número de sustancias que representan un posible peligro para la salud humana y a la limitación de recursos, es menester dar prioridad aquellas que son directamente consumidas por el hombre, como los fármacos y los aditivos alimentarios, y las que se utilizan ampliamente como plaguicidas o productos de consumo en el hogar (OPS-OMS, 1980; Vega y Reynaga, 1990).

La máxima prioridad debe corresponder a los compuestos de presunta toxicidad elevada, aguda, crónica o diferida (como la carcinogenicidad) o de mayor persistencia en el ambiente, o a los compuestos que contienen grupos químicos conocidos por estar asociados con estas propiedades. Esto se aplica también a los compuestos que inhiben la desactivación metabólica de sustancias químicas, pues pueden constituir una forma mas incidiosa de toxicidad (OPS-OMS, 1980; Vega y Reynaga, 1990)

Así, los criterios esenciales para determinar la prioridad en la selección de las sustancias que se pondrán

a prueba son los siguientes: a) indicación o sospecha de peligro para la sociedad humana, y el tipo y la gravedad de los efectos potenciales sobre la salud; b) grado probable de producción y empleo; c) potencial de persistencia en el medio; d) potencial de acumulación en la biota y en el ambiente y e) tipo y magnitud de las poblaciones que probablemente estarán expuestas. Por lo tanto, la sustancia de primera prioridad para someterse a pruebas será aquella que se clasifique en lugar destacado en relación a todos estos criterios o de su mayoría (Leynaud; 1979; OPS-OMS, 1980).

#### **II.5. MICROTÚBULOS**

Los microtúbulos fueron definidos como organelos citoplasmáticos por Slauterback (1963) y por Ledbetter y Porter (1963, 1964). Anteriormente su presencia había sido detectada por numerosos especialistas en microscopía electrónica, tanto en los protozoos como en los cilios y flagelos, en el huso de las células en división y en los axones de las neuronas. Posteriormente han sido descritos en una gran variedad de células vegetales por Newcomb (1969) y en células animales por Behnke y Forer (1966), encontrándose generalmente en el citoplasma, aunque también

han sido observados en determinados núcleos y en determinadas bacterias (Brown y Bertke, 1979; Giese, 1985).

Los microtúbulos son compuestos proteícos que, al corte transversal, presentan una porción central "clara"; su longitud es considerable, pudiendo superar los 10  $\mu\text{m}$ ; generalmente su estructura es rectilínea o ligeramente curvada; su diámetro externo es variable, aunque generalmente es de unos 25 Å, algunos de ellos son relativamente permanentes (como ocurre con los cilios) y otros se forman y degradan en poco tiempo (fibras del huso), los microtúbulos están formados por proteínas tubulares dispuestos en las hileras paralelas o en espiral, en círculos formados de 8 a 13 subunidades, alrededor de una porción circular clara, los túbulos pueden asociarse y compartir algunas de sus subunidades (Brown y Bertke, 1979).

Al parecer, los microtúbulos realizan sus funciones de dos formas interrelacionadas: 1) actúan a manera de plataforma, la cual es capaz de proporcionar el soporte estructural y 2) como parte de la maquinaria necesaria para cierto tipo de movimientos (Giese, 1985).

Probablemente la función menos comprendida de los microtúbulos se relaciona con su función de transporte de las sustancias intracelulares. La evidencia sugiere que no sólo sirve como soporte dentro de las células, sino que también participan como agentes en el transporte de macromoléculas y organelos subcelulares (Brown y Bertke, 1979; Giese, 1985).

## **II.6. CILIOS**

Los cilios son finas estructuras que se encuentran en la superficie de diversos tipos celulares, su función es la de proporcionar a la célula una relativa movilidad.

Si la célula u organismo que posee cilios o flagelos es de un tamaño pequeño y se halla libre, el movimiento de estas organelas permite su locomoción en el ambiente que le rodea. En cambio si las células son fijas, como las de la cubierta epitelial de la tráquea humana o de las branquias de una almeja, la acción de los cilios o de los flagelos da lugar al desplazamiento de fluido sobre la superficie celular (Brown y Bertke, 1979; Giese, 1985).

Las diferencias entre cilios y flagelos son poco importantes; ambos tipos presentan una estructura parecida. Sin embargo desde el punto de vista morfológico pueden establecerse ciertas distinciones. En general, los cilios

son de menor diámetro y mucho más cortos que los flagelos. Otra diferencia entre ambas formaciones es que, en general, los cilios son más numerosos que los flagelos, ya que su número alcanza varios centenares por célula. Desde el punto de vista funcional, en el momento en que el movimiento de un cilio se encuentra en la mitad de su trayectoria, el fluido se desplaza en ángulo recto en relación al eje principal del cilio. En cambio, los flagelos dan lugar a un movimiento que sigue aproximadamente el eje del flagelo.

Tanto los cilios y flagelos se hallan ampliamente distribuidos en el reino animal y en las algas. En los protozoos se encuentran en dos grandes clases: los ciliados y los flagelados (Brown y Bertke, 1979; Giese, 1985).

En los animales multicelulares o metazoos, estas estructuras poseen diversas funciones, ya que intervienen en la locomoción, en la ingesta; en la digestión, en la excreción, en la respiración, en la circulación y en la reproducción, actuando además como receptores para diversos sistemas sensitivos en forma modificada.

El estudio de los cilios al microscopio electrónico permitió determinar la existencia de 1) un tallo, 2) un cuerpo basal y 3) una raíz.

Los primeros intentos que se realizaron para estudiar la actividad ciliar se enfrentaron con la dificultad del rápido movimiento de los cilios. Sin embargo, Valentine (citado en Brown y Bertke, 1979) por el año de 1842, realizó una serie de observaciones que le permitieron describir cuatro tipos de actividad ciliar. Estas actividades eran 1) movimiento pendular, 2) movimiento angular en forma de anzuelo, 3) movimiento ondulatorio, y 4) movimiento infundibular (Brown y Bertke, 1979).

En el movimiento pendular, el cilio adopta una posición rígida, aunque sigue moviéndose a nivel de su base, produciéndose una pequeña incurvación.

En el movimiento en forma de anzuelo, el cilio se dobla mediante una angulación que se inicia en la base y continúa hasta su extremo, lo que hace que adopte una forma de anzuelo. En general, estos dos tipos de movimientos se observan en los cilios de metazoos. El movimiento ondulatorio es típico de los flagelados; este tipo de movimientos se inicia en la base del cilio y progresa hasta su extremidad. En algunos casos se producen ondulaciones sinusoidales (Brown y Bertke, 1979).

## II.7. GENERALIDADES DE LA ALMEJA Corbicula fluminea.

### II.7.1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

El género Corbicula es típico de ambientes dulceacuícolas y estuarinos del sureste de Asia, se distribuye en India, África, Islas del Pacífico, Europa y América (Britton y Morton, 1979; Morton, 1986, McMahon, 1991; Araujo et al., 1993; Ituarte, 1994).

Los primeros especímenes recolectados en América, fueron conchas vacías, localizadas en Vancouver, Columbia Británica, Canadá en 1924 (Counts, 1981). Es en el año de 1952 cuando se recolectan organismos en el Valle Imperial al extremo sur del estado de California, Estados Unidos de América (Fitch, 1953).

En Norteamérica Corbicula fluminea se distribuye en el sur del Canadá, en los Estados Unidos y en México (Cherry et al., 1980; Hillis y Mayden, 1985; Morton, 1986).

Debido a que los distritos de riego de Coachella, Valle Imperial en California, Estados Unidos y Valle de Mexicali en Baja California, México, se encuentran interconectados para recibir y distribuir el agua del Río Colorado, es posible que la almeja Corbicula fluminea habite en el Valle de Mexicali a partir de los años

cincuenta, fecha en la que por vez primera se registra su presencia en los canales del Valle Imperial (Fitch, 1953).

### II.7.2. TAXONOMÍA.

La almeja Corbicula fluminea es la única especie del género que se encuentra en Norteamérica. Las poblaciones de Corbicula en Norteamérica, en general son referidas con alguno de los tres nombres más utilizados para mencionar a la especie: Corbicula fluminea (Müller, 1774 en Newell, 1969) (Tabla VI) es el nombre que se utilizó para denominar a las primeras poblaciones (Burch, 1944); Corbicula manilensis Philippi, se empleó para designar a las poblaciones que posteriormente aparecieron en el medio oeste de los Estados Unidos (Sinclair, 1971) y de manera ocasional aparece el nombre de Corbicula leana Prime (Counts y Prezant, 1979). Estos diferentes nombres son sinonimias empleadas para las distintas poblaciones de Corbicula, sin embargo, se trata de la misma especie, y en este trabajo se optó por elegir la denominación taxonómica de Corbicula fluminea debido a que corresponde a la primera descripción.

### II.7.3. CICLO DE VIDA.

El modo de reproducción que presentan las poblaciones en Norteamérica es el hermafroditismo (Kraemer, 1978)

Tabla VI. Ubicación taxonómica de Corbicula fluminea  
(Tomado de Newell, 1969).

---

Clase: Pelecypoda

Subclase: Heterodonta

Órden: Veneroida

Superfamilia: Corbiculacea

Familia: Corbiculidae

Género: Corbicula

Especie: fluminea

---

aunque algunos organismos presentan un hermafroditismo protándrico (Morton, 1977). En su ciclo de vida presenta los estados de larva trocófora a las 14 horas de la fertilización, la etapa veligera de las 37 hasta las 40 h, la pediveligera a las 100 h y la etapa juvenil entre las 112 y 125 h (King et al., 1986). La madurez la alcanzan entre los 3 y 6 meses, cuando la longitud de su concha alcanza entre 6 y 10 mm (Kraemer y Galloway, 1986). Presenta dos épocas reproductivas al año, la primera durante la primavera y principios de verano, la segunda a principios del otoño (McMahon, 1983). La espermatogénesis ocurre sólo durante el periodo reproductivo, pero las gónadas contienen óvulos maduros durante todo el año (Kraemer y Galloway, 1986). La escala de temperaturas extremas que soporta es de 2° hasta 30°C, y presenta un desarrollo normal en una escala de 7° hasta 25°C (MacMahon, 1983).

#### **II.7.4. HÁBITAT.**

La almeja habita en aguas someras, tanto en ambientes lóticos y lénticos, el sustrato puede ser muy variado, grava, grava-arena, arena suelta, lodo o cieno; teniendo poblaciones numerosas en aguas bien oxigenadas (Horne y McIntosh, 1979; Belanger et al., 1985).

El hábitat donde reside la almeja son los canales que distribuyen y drenan las aguas para riego y desechos del Distrito de Riego No. 14; el cual dota de agua a las parcelas del Valle de Mexicali, Baja California y San Luis Río Colorado, Sonora. El agua se distribuye por medio de una extensa red de canales, que suman aproximadamente 3,000 Km de longitud (Coronado, 1981).

El ambiente donde reside, se caracteriza por la presencia de partículas disueltas de materia orgánica, microalgas, bacterias y detritos; sin embargo, en los últimos años en la ciudad y Valle de Mexicali se han desarrollado significativamente las actividades económicas y esto ha propiciado la presencia de sustancias tóxicas, que provienen principalmente de descargas domiciliarias, residuos de solventes y agroquímicos (fertilizantes y pesticidas) que son utilizados frecuentemente en la industria maquiladora y las actividades agrícolas (Gutierrez-Galindo, 1982). Dichas sustancias pueden ser vertidas fácilmente en los canales de conducción de agua para el riego de las parcelas (Pérez-Bastidas y Sánchez-Navarro, 1983); así como en los canales de conducción de agua a las plantas potabilizadoras de la red municipal de la ciudad de Mexicali y parte de su valle.

## OBJETIVO

Determinar la factibilidad de uso de la almeja dulceacuícola Corbicula fluminea (Müller, 1774) como organismo experimental en estudios toxicológicos in vitro e in vivo para la evaluación de los efectos citotóxicos ocasionados por agentes químicos.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la factibilidad de uso de la branquia de Corbicula fluminea para la detección y el análisis de los efectos citotóxicos ocasionados por la colchicina y el benomil.
- Mediante análisis in vitro comparar los efectos citotóxicos del benomil en dos bivalvos: el mejillón Mytilus californianus (Conrad, 1837) y en la almeja Corbicula fluminea.
- Analizar el comportamiento de la branquia de Corbicula fluminea bajo diferentes temperaturas y niveles de pH en experimentos in vitro.
- Determinar la concentración letal del fungicida benomil sobre la almeja Corbicula fluminea en condiciones in vivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.1. ÁREA DE ESTUDIO

El municipio de Mexicali cuenta con una extensión territorial de 13,935.8 Km<sup>2</sup>, es el segundo en extensión en el estado. Se caracteriza por tener dos zonas bien delimitadas, como lo son la zona urbana y la agrícola, siendo la última de gran importancia y la que ocupa la mayor extensión del municipio. El 95 % de la población participa de alguna forma en las actividades agropecuarias. Aunado a esto, Mexicali es la región mas importante del estado en materia agrícola y dicha actividad está basada en un modo de producción altamente tecnificado; que ha facilitado el establecimiento de agroindustrias asociadas a los cultivos de algodón, ajonjolí, trigo, alfalfa, cebada, espárrago, cebollín, tomate, col y uva, entre otros (Secretaría de Gobernación, 1988).

La densidad demográfica, el alto nivel de desarrollo económico, la disponibilidad de agua y energía eléctrica y

el espacio disponible, permiten que Mexicali sea considerado como el municipio con mayores potencialidades para un rápido desarrollo.

El Valle de Mexicali desde sus inicios ha tenido un desarrollo económico y social basado en la agricultura de riego; por lo cual el gobierno de México para asegurar el suministro de agua a la región, firmó en 1944 un acuerdo con Estados Unidos; en donde se estipula que a México le corresponden 1850 millones de m<sup>3</sup> al año (Secretaría de Gobernación, 1988). Por medio de un decreto presidencial el Distrito de Riego No. 14 fue establecido para distribuir las aguas provenientes del Río Colorado en las parcelas de cultivo del área (Secretaría de Gobernación, 1988).

#### **IV.1.2. LOCALIZACIÓN**

La zona abarca la ciudad de Mexicali y el Valle de la misma, ubicados en la porción noreste del estado de Baja California, pertenecientes al municipio de Mexicali y al Distrito de Riego No. 14.

Sus límites son: al norte, el Valle Imperial, perteneciente al estado de California, Estados Unidos; al oriente, La Mesa Arenosa de San Luis, perteneciente al Desierto de Altar, Sonora y al Valle de Yuma, en el estado de Arizona, Estados Unidos; al sur, el litoral del Golfo de

California y al oeste, la Sierra de los Cucapah (Secretaría de Gobernación, 1988).

#### **IV.1.3. CLIMA**

El clima para el área es cálido seco BW(h')hs(e'), con precipitaciones medias anuales de 50 mm, evaporación media anual de 170 mm y temperaturas promedio mayores de 22°C, siendo la temperatura máxima de 52°C, la media de 34°C y la mínima de 23°C, la temperatura del mes mas frío menor a los 12°C.

La dirección de los vientos dominantes son del noroeste al sureste, durante los meses de diciembre, enero, febrero, marzo, abril y en dirección sureste-noroeste durante los meses de junio, julio, agosto, septiembre, octubre, noviembre, los periodos de calma ocurren durante los meses de mayo y noviembre (Secretaría de Gobernación, 1988).

#### **IV.1.4. FISIOGRAFÍA**

La zona forma parte de lo que se denomina provincia fisiográfica del Colorado (Thompson, 1969) constituida por el material erosionado y depositado por el Río Colorado que ha dado lugar a los Valles de Yuma, Imperial y Mexicali, así como a las Mesas de Yuma, Andrade y San Luis.

En la zona los depósitos tienen un relieve suave y se encuentran prácticamente reducidos a una planicie en donde las pendientes son menores al 5 %. con respecto a su altura se encuentran ubicados entre los -2 bajo el nivel del mar y los 30 m sobre el nivel del mar (Secretaría de Gobernación, 1988).

#### **IV.1.5. HIDROLOGÍA**

##### **HIDROLOGÍA SUPERFICIAL**

La principal corriente con que cuenta el Valle de Mexicali es la del Río Colorado, que presenta un escurrimiento medio anual de 1,850,234 m<sup>3</sup> (93.7 % del escurrimiento medio anual en el Estado) y es utilizada para el riego del Distrito No. 14, así como para dotar de agua a las ciudades de Mexicali, Tecate y Tijuana.

El agua del Río Colorado es recibida en la presa Morelos y en el Canal Sánchez-Mejorada. De estos sitios el agua es distribuída a las 7 unidades del Distrito de Riego por medio de un sistema de canales abiertos.

El agua conducida a Mexicali llega por el canal Alimentador del Norte, mismo que abastece a las plantas potabilizadoras de dicha ciudad.

La calidad del agua entregada a México, tiene una salinidad media de 1.3 %, según análisis realizados por la

Comisión Internacional de Límites y Aguas (CILA) (SARH, 1975).

Existen otras corrientes como la del Río Hardy y el Río Nuevo, que han sido producidas por los drenes agrícolas de la región.

#### HIDROLOGÍA SUBTERRÁNEA

En el Valle se aprovechan aguas subterráneas extraídas de pozos por bombeo, existen aproximadamente 470 pozos de uso agrícola y 789 de uso doméstico. De los primeros 180 pertenecen a particulares y 290 al plan federal. Estos pozos tienen una recarga media anual de 800,000 m<sup>3</sup>, pero se explotan 1,305,894 m<sup>3</sup>, existiendo una sobreexplotación del 30 %.

En las cercanías de Mexicali los niveles del agua se encuentran muy someros, las profundidades máximas de los niveles estáticos varían entre 5 y 6 m y se encuentran al noreste de la ciudad.

La salinidad del agua subterránea en el Valle de Mexicali, presenta problemas de contaminación debido a que existe entre la ciudad y la zona de Cerro Prieto una salinidad de 8000 ‰, esto puede atribuirse al avance de la intrusión salina, provocada por el abatimiento de los

niveles freáticos, ocasionado por la sobreexplotación, a los que están sujetos los pozos de uso agrícola.

En las proximidades del Río Colorado la salinidad disminuye, lo que sugiere que no existe contaminación del acuífero por infiltración de agua salada a lo largo del cauce (Secretaría de Gobernación, 1988).

#### **IV.1.6. VEGETACIÓN**

En lo que respecta a vegetación natural, la condición de aridez de la zona, ha tenido como consecuencia la presencia de especies vegetales silvestres típicamente xerófitas, que caracterizan el panorama general de la vegetación natural en las áreas no utilizadas en las actividades agrícolas.

Aproximadamente el 60 % de la superficie que conforma el Valle de Mexicali es utilizado para actividades agrícolas de riego, existiendo tan sólo el 40 % de la superficie que por sus características no han podido ser incorporadas en estas labores.

La población del municipio según el Censo General de Población de 1995, fue de 696,034 habitantes que representan el 32.95% de la población del Estado. Las localidades que más población agrupan son las de ciudad de Mexicali, el Puerto de San Felipe y las delegaciones de:

Los Algodones, Cd. Morelos, Benito Juárez y Ciudad Guadalupe Victoria (INEGI,1997).

#### **IV.2. SELECCIÓN DE LA ESPECIE QUE SE UTILIZÓ.**

Se seleccionó a partir de una revisión bibliográfica sobre los aspectos biológicos, tales como: distribución geográfica, reproducción, importancia ecológica, entre otros. Además se corroboraron en un sentido práctico numerosos datos como lo son, facilidad de identificación, de recolección, de transporte, de manejo y mantenimiento en condiciones de laboratorio.

#### **IV.3. UBICACIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO Y TIEMPO DE RECOLECCIÓN.**

Una vez seleccionada la especie que se utilizaría como modelo de estudio, la almeja Corbicula fluminea, se procedió a seleccionar el sitio de recolección por medio de una exploración directa en el Valle de Mexicali, Baja California. La zona se ubicó en la periferia de la mancha urbana de la Cd. de Mexicali, dentro de un área en transición en el cambio de uso del suelo agrícola, a un uso urbano residencial, cerca del Instituto Tecnológico de Mexicali (Fig. 1) Se realizaron recolectas en los meses de noviembre de 1994 y junio de 1996.

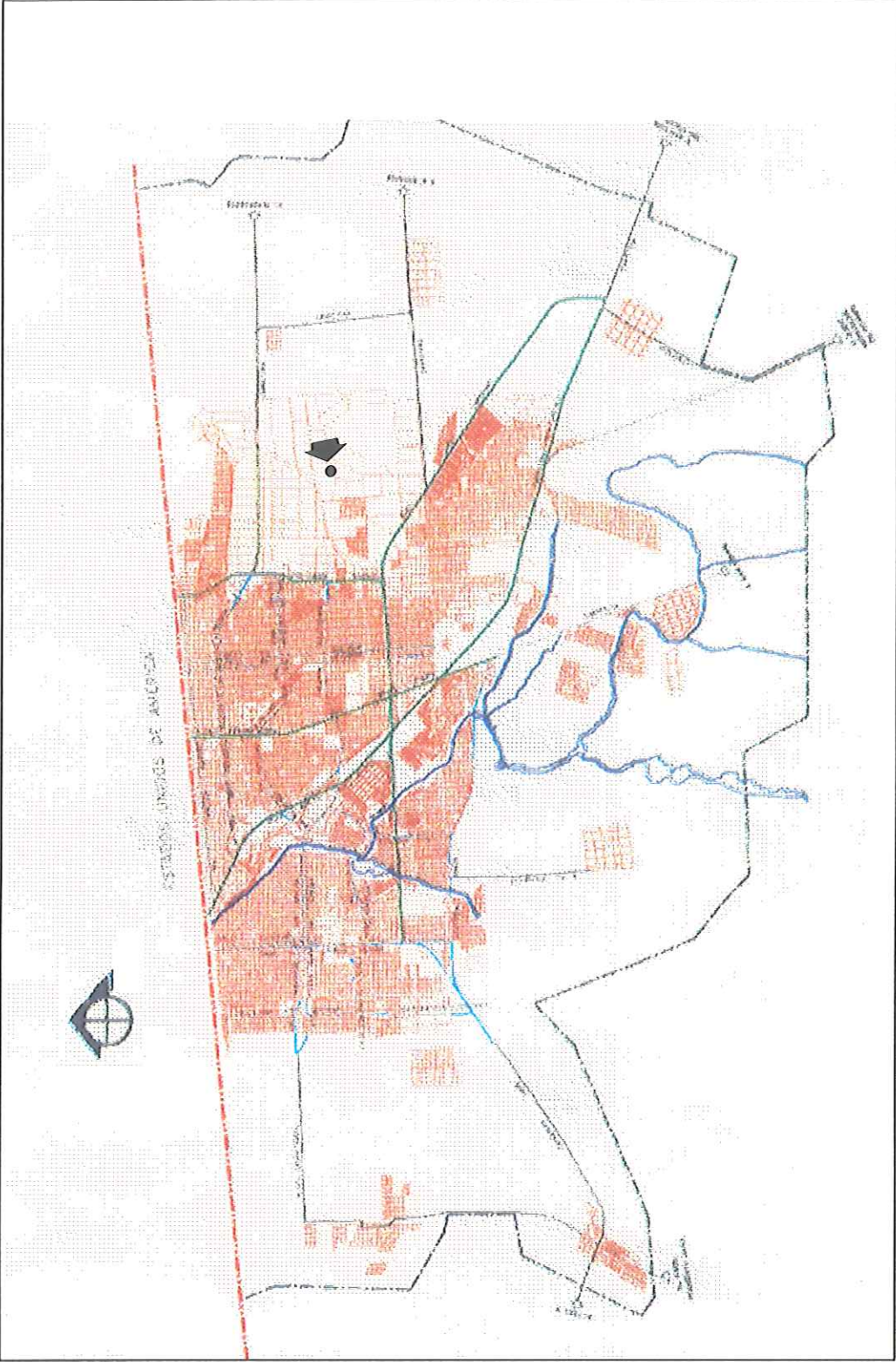


Figura 1. Ubicación de la zona de recolección de la almeja Corbicula fluminea en la Cd. De Mexicali, B.C.

Para objeto de comparación se empleo al mejillón Mytilus californianus; la recolección de los mejillones se realizó en el mes de junio de 1996, en el sitio conocido como "Motel Puesta del Sol" que se localiza entre el poblado de El Sauzal de Rodríguez y la Cd. de Ensenada, Baja California (Fig. 2).

#### **IV.4. CONDICIONES DE MANEJO DE LOS ORGANISMOS.**

Las almejas y los mejillones se mantuvieron en acuarios independientes de aproximadamente 140 l de capacidad provistos de filtro biológico y a temperatura ambiente en el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California, y se procesaron en diversas fechas posteriores. El total de organismos procesados fue de 480 almejas y 70 mejillones.

Las almejas fueron recolectadas de un canal secundario de riego agrícola, revestido de concreto, dentro del cual se ubicaron bancos de almejas entre el fango, después se procedió a recoger manualmente a los organismos, cuyas tallas variaron de entre 5 hasta 44 mm. Para su traslado se colocaron dentro de cubetas de plástico de 19 l de capacidad con agua potable.

Los mejillones fueron recolectados en la playa que se localiza frente al "Motel Puesta del Sol", en este sitio se

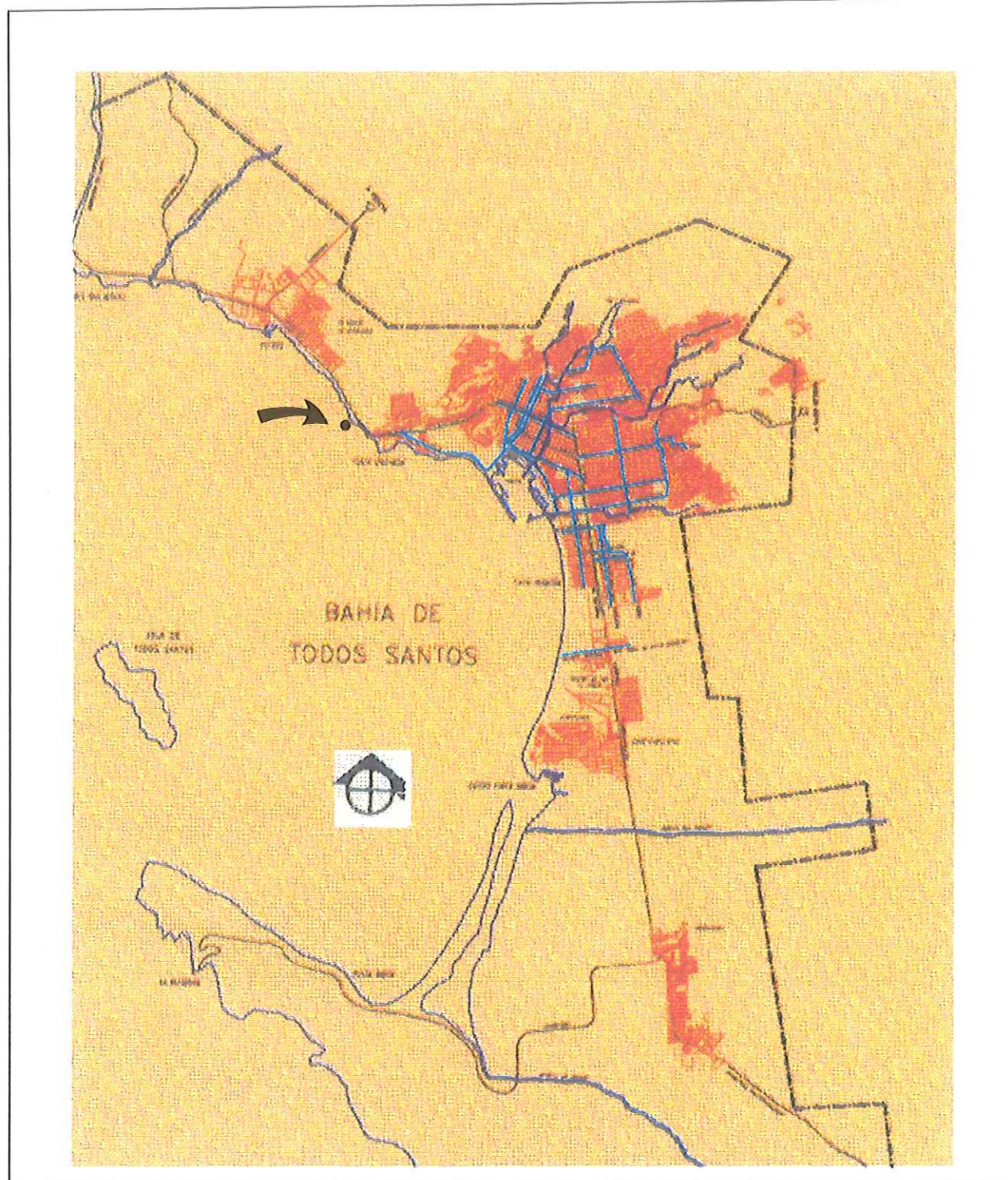


Figura 2. Ubicación de la zona de recolección del mejillón Mytilus californianus en la Bahía de Ensenada, B.C.

procedió a localizar bancos de mejillones para su recolección, las tallas variaron de 3 hasta 7 cm. Para su traslado se colocaron dentro de cubetas de plástico de 19 l de capacidad.

#### **IV.5. CULTIVO DE BRANQUIAS**

Para el cultivo de branquias se empleó la metodología propuesta por Márquez-Becerra (1993) para el cultivo de branquias, la cual consta de 6 pasos o principios:

1. Medio de Benex, (Tabla VII) agua de mar y agua potable.
2. El medio de Benex se esterilizó con filtro milliporo de 0.22  $\mu\text{m}$ .
2. Todos los instrumentos y la cristalería fueron lavados y esterilizados de acuerdo con procedimientos establecidos para el cultivo de tejidos.
3. Se probaron dos tipos de recipientes para el cultivo, que fueron, cajas de Petri con capacidad de 10 ml y cajas de Siracusa con capacidad de 25 ml.
4. Se trabajó con distintos volúmenes de medio: 5, 10, 15 y 25 ml; no se aplicó ningún tipo de antibiótico.
5. Los cultivos se realizaron en campana de flujo laminar.
6. Se realizaron evaluaciones cada 4, 8 y 12 horas durante un periodo de 96 horas.

Tabla VII. Constituyentes del medio Benex (Tomado de Márquez, 1993).

SUSTANCIAS	CONCENTRACIÓN (g/l)
NaCl	10.00
KCl	1.00
MgCl <sub>2</sub>	0.15
CaCl <sub>2</sub>	0.20
NaHCO <sub>3</sub>	0.70
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.30
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.12
Glucosa	2.00
Vitamina C	0.10
Amortiguador de fosfato y bicarbonato	
Penicilina (opcional)	(UI/ $\mu$ l) 100
Colimicina	(UI/ $\mu$ l) 500

#### IV.6. EVALUACIÓN DE LOS CULTIVOS.

El sistema de evaluación empleado fue el propuesto por Márquez-Becerra (1993) el cual a continuación se describe: en cada evaluación se revizó lo siguiente: a) movimiento ciliar, b) tamaño de los cilios, c) forma de los cilios, d) coloración del tejido, y e) aspectos generales del cultivo como textura, color del medio y olor.

La evaluación en terminos cuantitativos para el cultivo de branquia en general es el siguiente: el valor máximo es 10 y corresponde a los cultivos que presentan el aspecto de un cultivo inicial; 8 al mantenimiento de cuatro características relevantes, tales como: movimiento, forma, longitud ciliar, coloración; 6 corresponde a la conservación de sólo tres de los rasgos antes citados; 4 a la conservación de sólo dos de los rasgos; 2 corresponde a una sola característica y 0 es igual a la pérdida de cilios o a un deterioro drástico (Tabla VIII).

La colchicina se empleó como testigo positivo ya que es un inhibidor de la polimerización de la tubulina. El agente a probar su toxicidad fué el benomil, que es un fungicida de amplio espectro, el cual también actúa sobre la tubulina de las células fungosas.

Tabla VIII. Resumen del sistema de evaluación propuesto para el cultivo de branquia (Tomado de Márquez, 1993).

CALIFICACIÓN	CARACTERÍSTICAS
10	Corresponde a los cultivos que presentan el aspecto de un cultivo inicial.
8	Al mantenimiento de 4 características relevantes, tales como movimiento, forma, longitud ciliar, coloración.
6	Corresponde a la conservación de sólo tres de los rasgos antes citados.
4	A la conservación de sólo dos de los rasgos.
2	Corresponde a una sola característica, y
0	Es igual a la pérdida de cilios o a un deterioro drástico.

Este sistema de calificación podría tener otras notas si así se quisiera.

Las concentraciones aplicadas fueron: colchicina al 0.01 %, 0.1 % y al 0.5 % y benomil a 500 µg/ml, 40 µg/ml, 0.64 µg/ml y 2.56 ng/ml. El testigo fue medio de Benex.

Las características a evaluarse se definieron como a continuación se indica: a) Movimiento ciliar (acelerado, normal, disminuido o sin movimiento; b) Tamaño (muy largo, normal, corto); c) Forma (normal, anormal); d) Coloración (normal, anormal); e) Textura (normal, anormal) (Tabla IX).

Por normal se entiende a las características de las branquias obtenidas de organismos recién sacrificados.

#### **IV.7. DIFERENTES TEMPERATURAS EN EL CULTIVO DE BRANQUIAS.**

Debido a que no se encontró información referente al comportamiento de la branquia de Corbicula fluminea en condiciones de cultivo, se realizaron ensayos con la finalidad de observar el comportamiento de la branquia en cultivos con diferentes temperaturas para determinar si las bajas o elevadas temperaturas afectan el desarrollo de los cultivos de branquias. Las temperaturas ensayadas fueron: 8, 18 y 21°C; hasta por un periodo de 96 horas. El medio de cultivo utilizado fue medio de Benex.

Tabla IX. Características que se evaluaron en el cultivo de branquias de la almeja Corbicula el mejillón Mytilus (Tomado de Márquez, 1993).

A) MOVIMIENTO CILIAR			
+++ = acelerado	++ = normal	+ = disminuido	0 = sin movimiento
B) TAMAÑO			
+++ = muy largo	++ = normal	+ = corto	
C) FORMA			
NA = normal		A = anormal	
D) COLORACIÓN			
PN = normal		DP = despigmentado	
E) TEXTURA			
NA = normal		A = anormal	

Por normal se entiende a las características de las branquias obtenidas de organismos recién sacrificados.

#### IV.8. DIFERENTES NIVELES DE pH EN EL CULTIVO DE BRANQUIAS

Al igual que en el ensayo de temperaturas, no se encontró información referente al comportamiento de la branquia de Corbicula fluminea en presencia de distintos niveles de pH en condiciones de cultivo, por lo que también se realizaron ensayos con la finalidad de observar el comportamiento. Los pH ensayados fueron: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11.5. Hasta por un periodo de 48 horas.

#### IV.9. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL<sub>50</sub>) DEL BENOMIL EN ALMEJA Corbicula fluminea.

En la realización de los experimentos de concentración letal (CL<sub>50</sub>) se utilizó a la almeja Corbicula fluminea. Los recipientes que se utilizaron fueron acuarios provistos con aireación constante y dentro de cada uno se colocaron diez organismos.

Las soluciones que se utilizaron fueron de un volumen de 900 ml, mismas que se cambiaron cada 24 horas, con el objeto de que la concentración del tóxico fuese constante. El tóxico empleado fue benomil (benlate), un fungicida de amplio espectro. Las soluciones empleadas fueron: benomil en cuatro concentraciones que fueron 500 µg/ml, 40 µg/ml, 1.6 µg/ml, 0.64 µg/ml; como testigo se utilizó agua potable.

Las evaluaciones se realizaron cada 4, 12 y 24 h, y los rasgos registrados fueron secreción de moco, respuesta a estímulos mecánicos, abertura y cierre de valvas, sobrevivencia y muerte.

Una práctica que se utilizó fue la de realizar un "baño de recuperación", cuando en el acuario habían muerto el 50 % de los organismos, esto con la finalidad de confirmar si efectivamente estaban muertos.

#### **IV.10. ANÁLISIS DE DATOS**

Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis a un nivel de significancia del 5% (Sokal y Rohlf, 1981). Con las siguientes hipótesis estadísticas: Ho: todos los tratamientos son similares en cuanto a la variable de interés. Ha: al menos uno de los tratamientos es diferente.

## RESULTADOS

### V.1. EFECTOS DE TEMPERATURAS EN CULTIVO DE BRANQUIAS DE LA ALMEJA Corbicula fluminea.

Los experimentos con almeja sobre el cultivo de las branquias y de la actividad ciliar a temperaturas de 8°, 18° Y 21°C (Fig. 3) revelan que un cambio en el factor ambiental de temperatura no afecta las características observadas para la evaluación (movimiento ciliar, forma de los cilios, tamaño, coloracion y textura) de la branquia. Este experimento tiene su valor, ya que son factores que cambian en la naturaleza, en ambientes perturbados y también pueden variar durante la experimentación.

El medio fisiológico de Benex, funciona adecuadamente en el cultivo de branquias, por lo que puede usarse como testigo durante los ensayos de toxicidad.

Otro resultado es el hecho de que la apariencia de los cultivos a 24 horas es semejante a las de un cultivo inicial. En las primeras 24 horas, no se presentaron

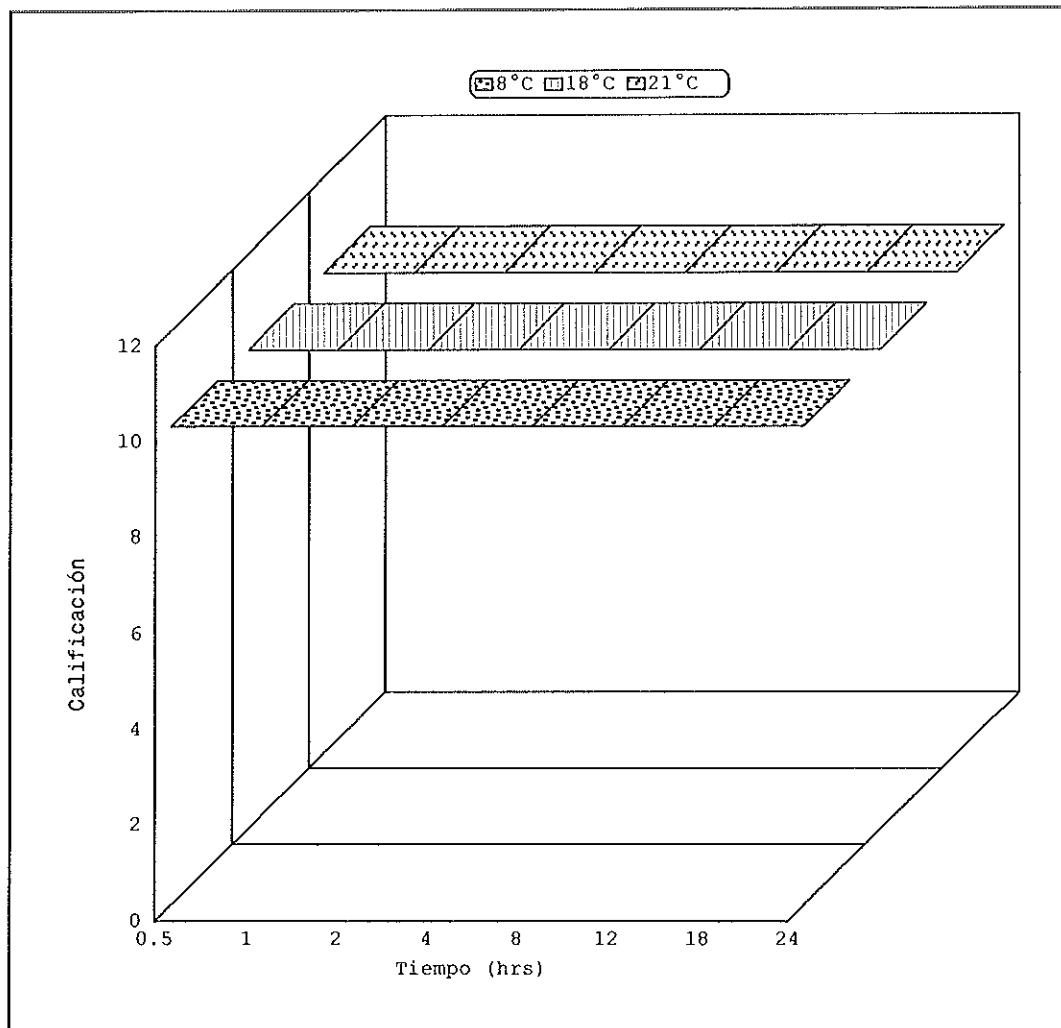


Figura 3. Se observa el comportamiento del cultivo de branquias de la almeja *Corbicula fluminea* a diferentes temperaturas. La actividad ciliar y la calidad del cultivo permanece sin modificaciones hasta las 24 h.

alteraciones o modificaciones en alguna de las características de las branquias y de los cilios.

**V.2. EFECTOS DE DIFERENTES NIVELES DE pH EN EL CULTIVO DE BRANQUIAS DE LA ALMEJA Corbicula fluminea.**

Los niveles de pH (Fig. 4) fueron evaluados durante 48 horas. Los resultados de los ensayos muestran que niveles bajos de pH (4 y 5) afectan de manera inmediata y evidente la actividad ciliar de los cultivos, disminuyendo esta de manera paulatina hasta quedar sin movimiento alguno; sin embargo, las características generales de la branquia (coloración, textura y olor) permanecen sin modificaciones aparentes, y son semejantes a las del cultivo inicial

A niveles de pH 10, el cultivo de la branquia permanece con una calificación de diez. Después de las 2 horas la pérdida de características es total, alcanzando una calificación de cero. A niveles de pH 11.5 no se observó actividad ciliar, ni ninguna otra característica de la branquia, debido a que desde el inicio el tejido se disgrega de manera instantánea.

Dentro de los diferentes niveles de pH suministrados, con escala de pH entre 6 hasta 9 demostraron ser adecuados para el desarrollo de los experimentos de cultivo de branquia durante un periodo de 24 horas, obteniendo en

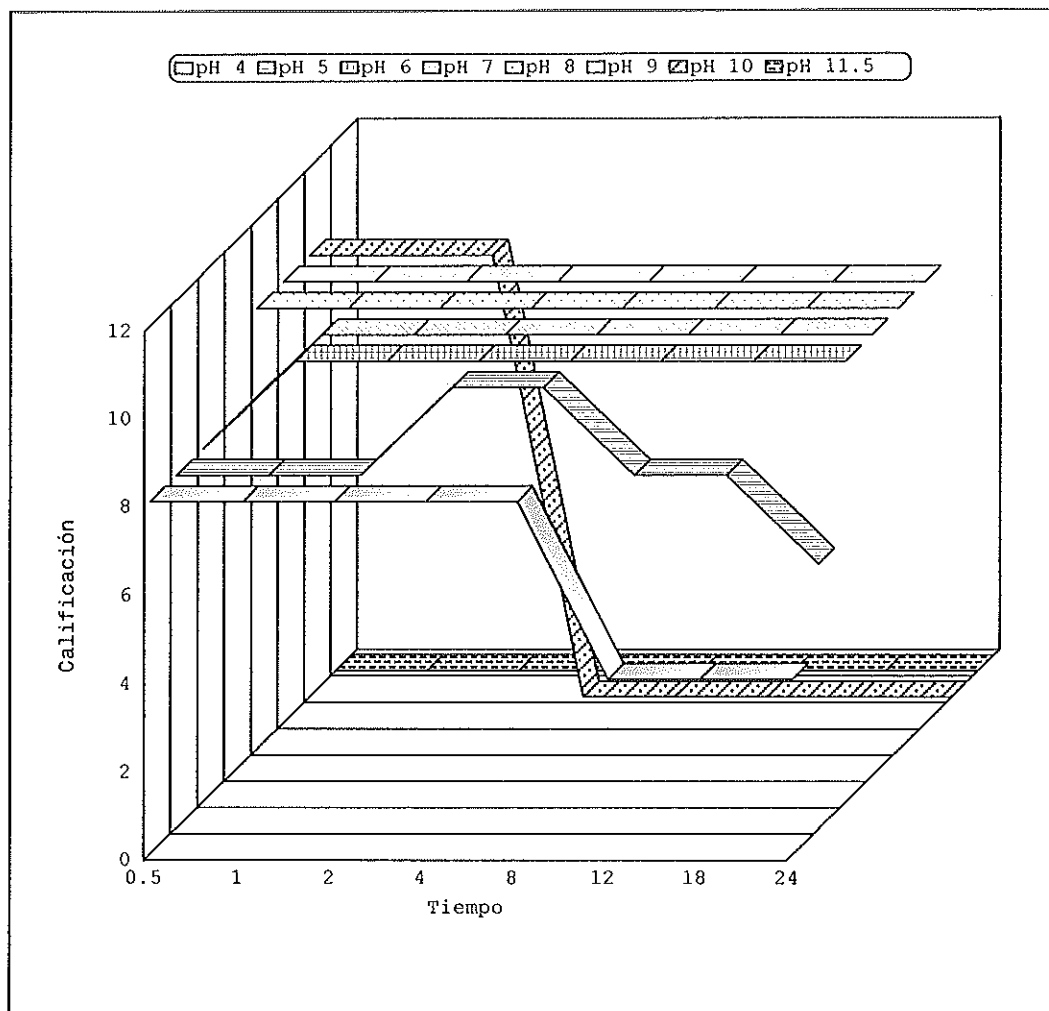


Figura 4. Se muestra el comportamiento del cultivo de branquias de la almeja *Corbicula fluminea* durante 24 h en presencia de distintos niveles de pH. El cultivo y la actividad ciliar permanece sin modificaciones dentro de una escala de pH 6 hasta pH 9.

estos cultivos una calificación de diez, ésto es, mantienen las características de un cultivo inicial.

Las características que se evaluaron en el cultivo, fueron estadísticamente diferentes entre los distintos niveles de pH probados (prueba Kruskal-Wallis,  $H=34.723$ ; g.l.=7;  $p=0.00$ ).

### **V.3. EFECTOS DE LA TOXICIDAD DE LA COLCHICINA EN EL CULTIVO DE BRANQUIAS DE LA ALMEJA Corbicula fluminea Y EL MEJILLÓN Mytilus californianus.**

Corbicula fluminea (almeja). Los efectos de la colchicina (Fig. 5) se evaluaron durante un periodo de 72 horas. El análisis de toxicidad en el cultivo de branquias muestran que la respuesta en concentraciones de 0.5 y 0.1 % es semejante, iniciándose el deterioro de los cultivos entre las 4 y las 8 horas. La concentración de 0.01 % presenta una calificación de diez durante las primeras 24 horas, después de transcurrido este tiempo el cultivo de branquia tiende a perder características rápidamente.

Las características que se evaluaron en el cultivo, fueron estadísticamente diferentes entre los distintos tratamientos probados (prueba Kruskal-Wallis,  $H=9.985$ ; g.l.=3;  $p=0.024$ ).

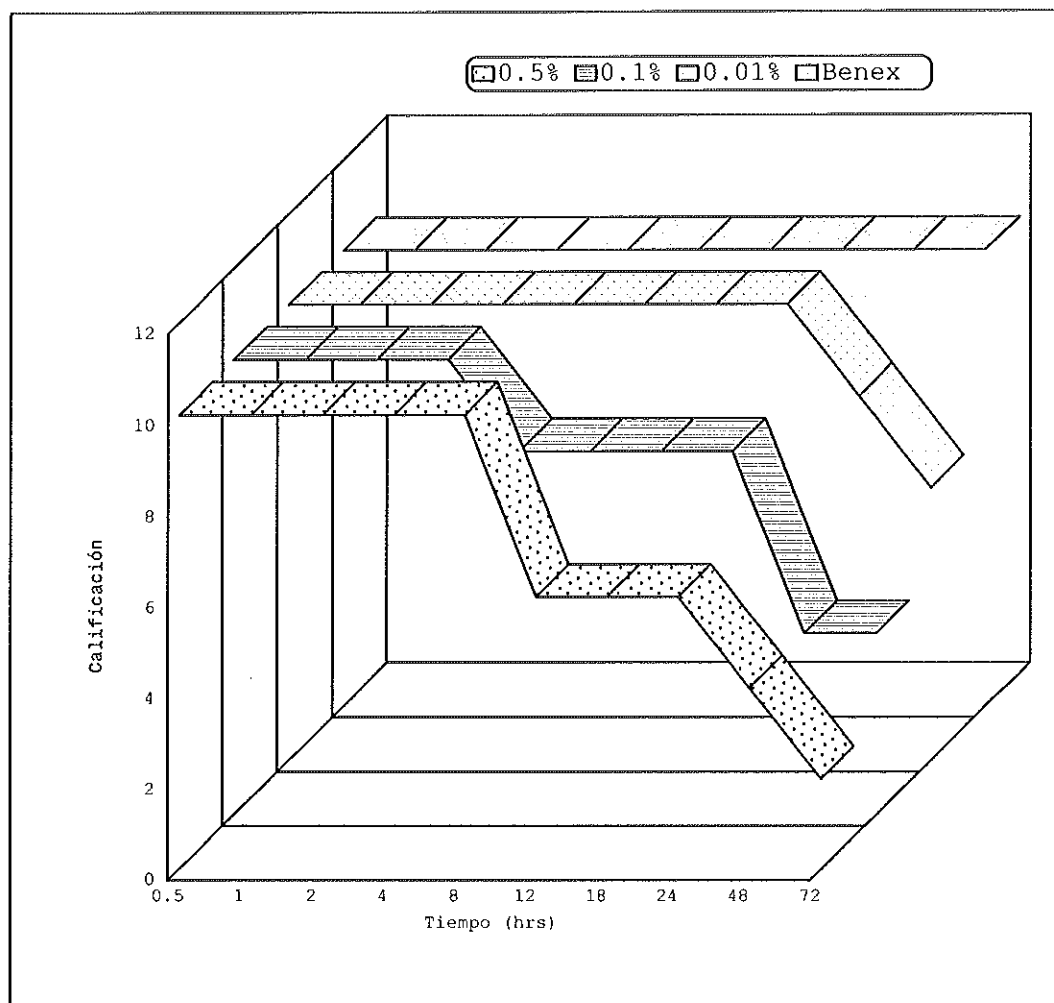


Figura 5. Se muestra el comportamiento del cultivo de branquias de la almeja *Corbicula fluminea* hasta las 72 horas, en presencia de varias concentraciones de colchicina.

Mytilus californianus (mejillón). El seguimiento del cultivo con colchicina (Fig.6) tuvo una duración de 12 horas. Los efectos de la colchicina en las branquias del mejillón se manifiestan desde el inicio del cultivo a una concentración de 0.5 % ya que únicamente logró mantener una calificación de seis durante las primeras 4 horas, pasadas las 4 horas el cultivo decae rápidamente hasta obtener una calificación de dos a las 12 horas de iniciado.

Las concentraciones de 0.1 y 0.01 % presentan un efecto similar en el cultivo de branquia ya que en las dos logran mantener una calificación de ocho durante la primer hora de iniciado el cultivo. Después el cultivo desciende a una calificación de seis, manteniéndose en la misma durante las siguientes 7 horas, hasta que, el cultivo decae a una calificación de cuatro.

Es evidente que la branquia del mejillón es sensible a la toxicidad de la colchicina debido a que el testigo (medio de Benex) siempre permaneció con una calificación de diez, a diferencia de los cultivos con distintas concentraciones de colchicina.

Las características que se evaluaron en el cultivo, fueron estadísticamente diferentes entre los distintos

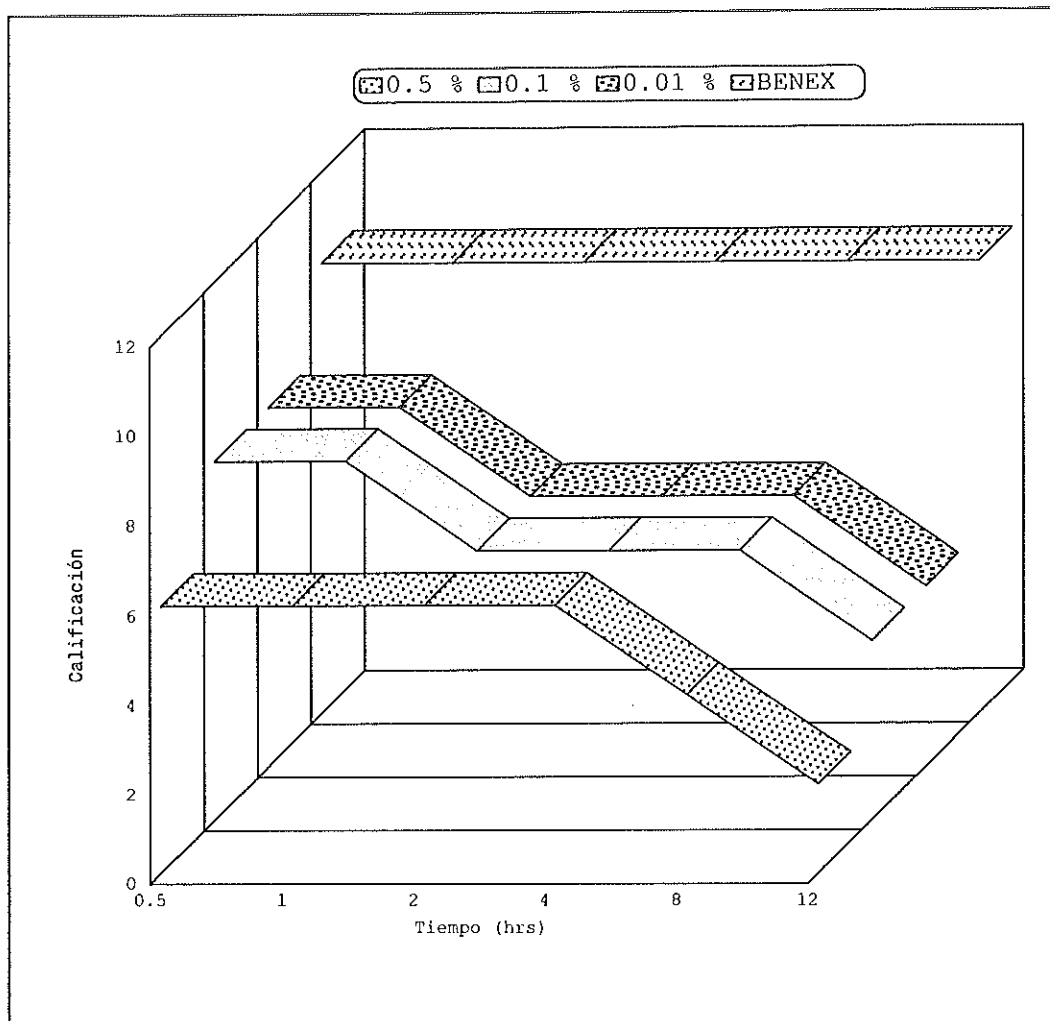


Figura 6. Se muestra el comportamiento del cultivo de branquias del mejillón *Mytilus californianus* hasta las 12 h, en presencia de varias concentraciones de colchicina. Se observa que desde el inicio del cultivo el deterioro es evidente.

tratamientos probados (prueba Kruskal-Wallis,  $H=15.530$ ;  $g.l.=3$ ;  $p=0.002$ ).

**V.4. EFECTOS DE LA TOXICIDAD DEL BENOMIL EN EL CULTIVO DE BRANQUIAS DE LA ALMEJA Corbicula fluminea Y EL MEJILLÓN Mytilus californianus.**

Corbicula fluminea (almeja). Los experimentos con benomil para el cultivo de branquia de la almeja (Fig.7) se realizó en un periodo de 48 horas.

El comportamiento observado es el siguiente: las dos concentraciones mas elevadas presentan una tendencia similar, debido al rápido deterioro que provocan en los cultivos. En la concentración de 40  $\mu\text{g/ml}$  se observa una pérdida de 4 características en la primer hora de iniciado el cultivo, y presenta una calificación de dos. La concentración de 1.6  $\mu\text{g/ml}$  pierde 3 características en la primer hora, obteniendo una calificación de cuatro; sin embargo, a partir de las 4 horas de iniciado el cultivo las dos concentraciones anteriores muestran efectos similares.

El deterioro que ocasiona la concentración de 0.64  $\mu\text{g/ml}$  aparece a partir de las dos primeras horas del inicio, manteniéndose en una calificación de 6 durante el resto del experimento.

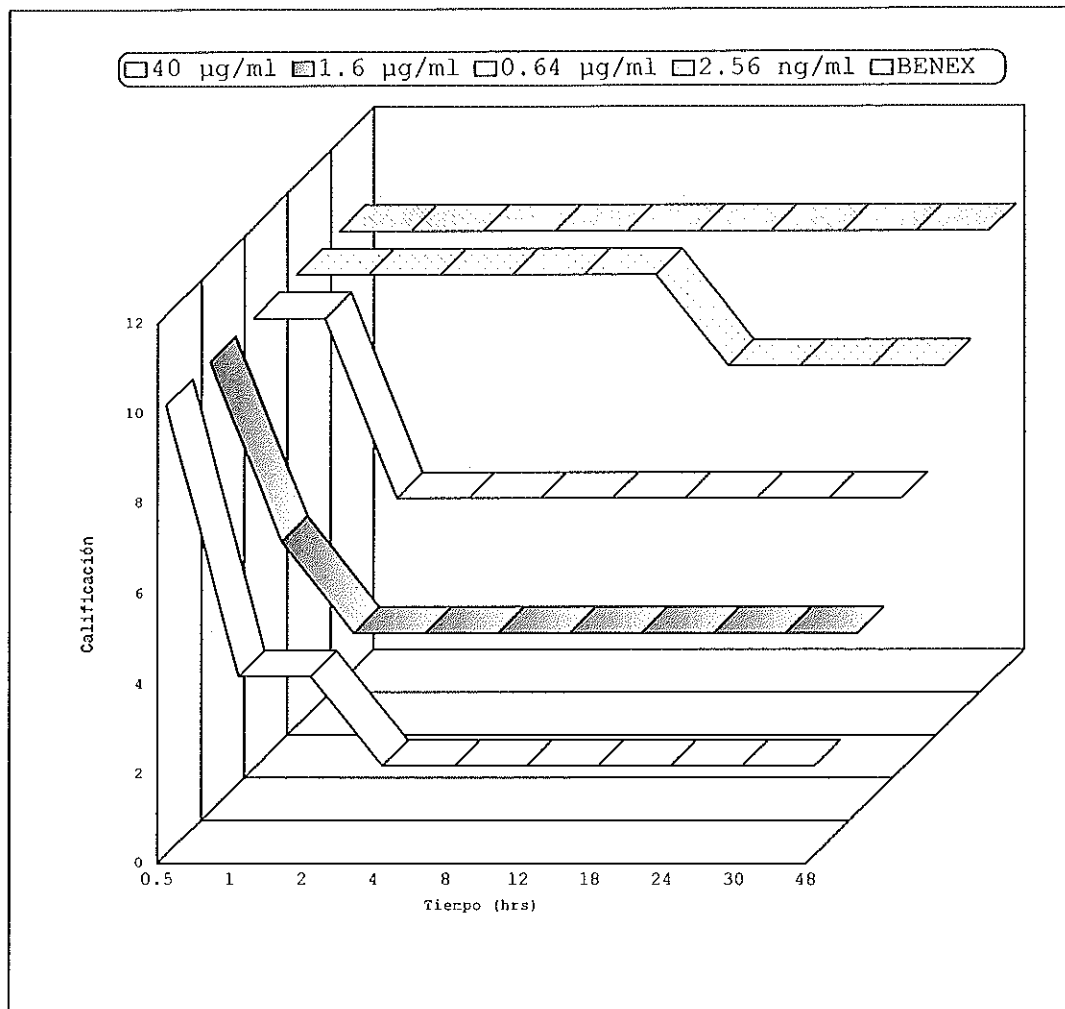


Figura 7. Se muestran los efectos del benomil en el cultivo de branquias de la almeja *Corbicula*. En el experimento a 48 h, se observa un deterioro dependiente de la concentración.

El cultivo realizado con la concentración más baja (2.56 ng/ml) no presenta efecto alguno durante las primeras 12 horas. A partir de las 18 horas se presenta una pérdida de una característica, la cual se manifestó en la disminución de la actividad ciliar.

Las características que se evaluaron en el cultivo, fueron estadísticamente diferentes entre los distintos tratamientos probados con benomil (prueba Kruskal-Wallis,  $H=34.578$ ; g.l.= 4;  $p=:0.000$ ).

El cultivo con medio de Benex (testigo) no presentó ninguna modificación en sus características durante el desarrollo del experimento, manteniendo una calificación de diez.

**Mytilus californianus (mejillón)**. El experimento con benomil utilizando la branquia de mejillón (Fig. 8) se realizó durante 8 horas. La concentración de 40  $\mu\text{g/ml}$ , presentó un efecto drástico perdiendo la característica de coloración del tejido, y a la primer hora se presenta una modificación de la longitud ciliar, así como también una modificación en la textura. A la segunda hora ocurre la pérdida de movilidad de los cilios.

La concentración de 1.6  $\mu\text{g/ml}$  al inicio del experimento, presentó una calificación de diez, sin

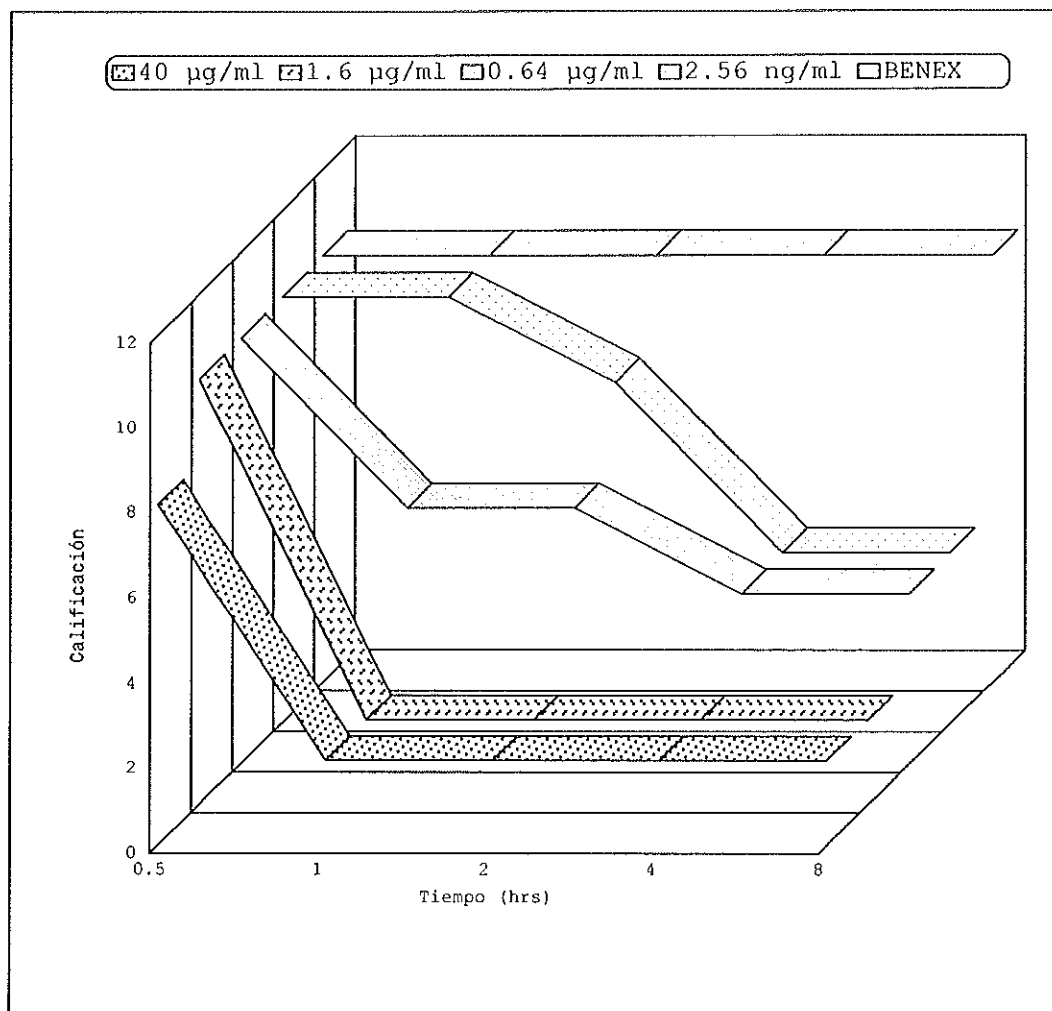


Figura 8. Se muestran los efectos del benomil en el cultivo de branquias del mejillón *Mytilus*. Se observa que el mejillón es mas sensible al benomil ya que el daño es mayor en menor tiempo.

embargo, a partir de la primer hora la calificación desciende a dos, permaneciendo así durante el resto del experimento. A 0.64 µg/ml al inicio del experimento la calificación fue diez, pero a la primer hora descendió a seis.

A 2.56 ng/ml se observa un comportamiento distinto, ya que durante la primer hora se mantuvo con una calificación de diez; a las dos horas, perdió una característica y durante las siguientes dos horas el cultivo perdió dos características mas, por lo que la calificación bajo a cuatro y asi permaneció el resto del tiempo experimental.

Las características que se evaluaron en el cultivo, fueron estadísticamente diferentes entre los distintos tratamientos probados con benomil (prueba Kruskal-Wallis,  $H=13.959$ ; g.l.= 4;  $p=:0.007$ ).

En todos los testigos (medio de Benex) la calificación fue diez.

#### **V.5. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA DEL BENOMIL EN ALMEJA Corbicula fluminea.**

Los experimentos in vivo (Fig.9) se realizaron durante 6 días. Los resultados registrados muestran que concentraciones de 500 µg/ml de benomil son suficientes para matar al 50 % de los organismos en un plazo de 48 a 72

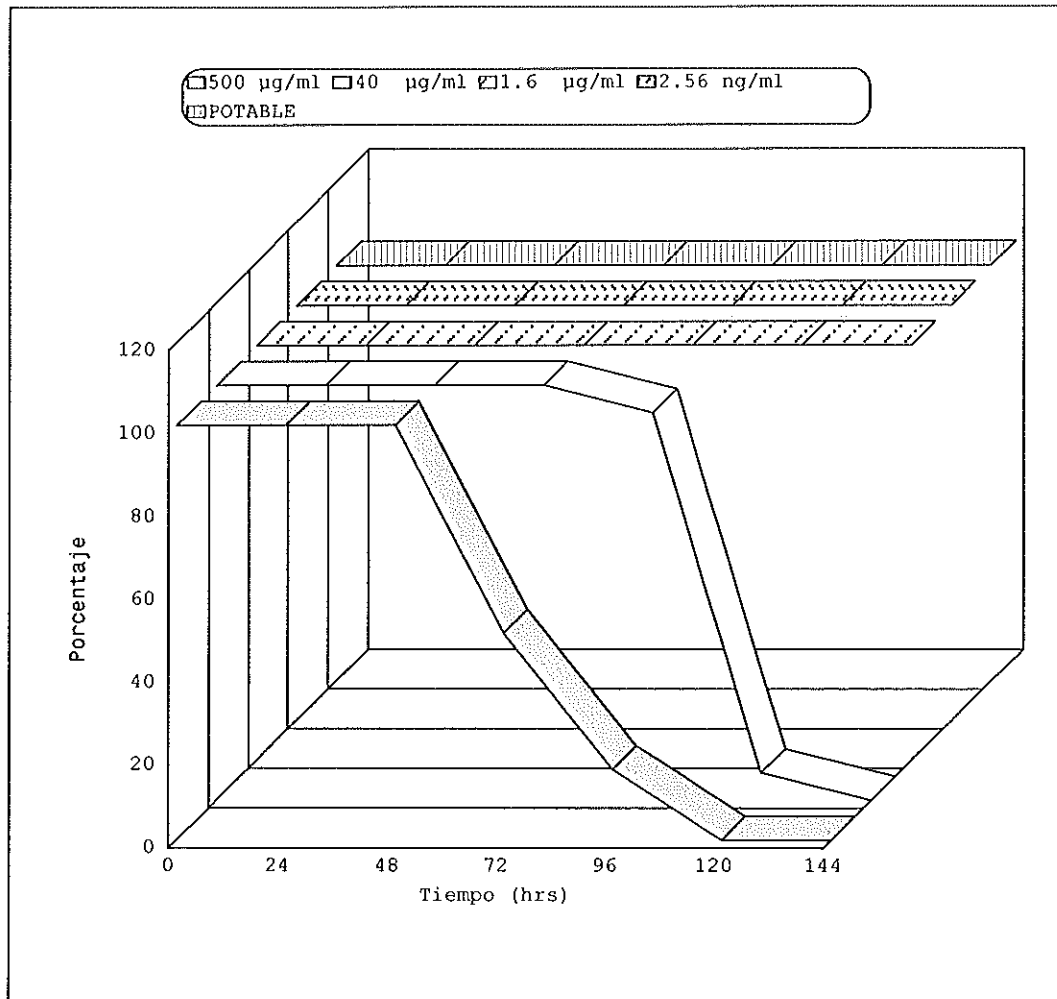


Figura 9. Se indican los porcentajes de sobrevivencia de la almeja *Corbicula fluminea* durante 6 días de exposición a distintas concentraciones de benomil. A una concentración de 500 µg/ml se observa una mortalidad media elevada a las 72 h.

horas. La concentración de 40 µg/ml afecta la sobrevivencia del 50 % de los organismos entre 96 hasta 120 horas. A diferencia de los resultados in vitro para la misma concentración, donde aparecen los efectos en la primer hora de inicio del cultivo. Con el resto de las concentraciones (1.6 µg/ml y 2.56 ng/ml) se prosiguió con el experimento durante 15 días, en las mismas condiciones antes descritas, sin observarse mortalidad en los acuarios. Es conveniente indicar que el testigo utilizado fue agua potable.

Las características que se evaluaron en el experimento, fueron estadísticamente diferentes entre los distintos tratamientos probados (prueba Kruskal-Wallis,  $H=13.193$ ; g.l.= 4;  $p=:0.010$ ).

## DISCUSIÓN

En este estudio de la evaluación de los efectos toxicológicos in vitro e in vivo de agentes químicos sobre la almeja Corbicula fluminea, se encontró que la temperatura es un factor ambiental que no afectó el desarrollo de los cultivos de branquias de la almeja, debido a que ninguna de las temperaturas ensayadas (8°, 18° y 21°C) modificó las características evaluadas durante los experimentos (Tabla IX). Lo anterior sigiere que los ensayos pueden realizarse por lo menos durante 96 horas sin complicación.

La escala de temperatura aquí ensayada, posibilita la aplicación de la técnica en cualquier época del año y también resalta el hecho de que el medio de Benex, puede ser utilizado como un excelente testigo negativo en cualquier análisis de toxicidad, utilizando como cultivo de pruebas branquias de bivalvos.

Asimismo, el conocimiento de un margen determinado de temperatura, además de resultar ventajoso para su aplicación en cualquier época del año, permite que los costos de ejecución de los ensayos sean más económicos, al no requerir instalaciones con temperatura controlada, ni laboratorios sofisticados.

Otro resultado del presente estudio, es el efecto de los distintos niveles de pH, sobre las branquias de la almeja Corbicula, donde los niveles bajos (pH 4 y 5) y altos (pH 10 y 11.5) (Fig. 4) alteraron rápidamente las características de las branquias, sin embargo, en la escala de pH de 6 hasta 9, la branquia no fue afectada.

El resultado de los niveles de pH altos y bajos resulta interesante, dado que en los ambientes perturbados (por la acción humana principalmente) los niveles de pH pueden cambiar y estar alejados de un nivel neutro. Por dar un ejemplo se puede citar una actividad cotidiana de los prestadores de servicio de agua entubada en las ciudades, que consiste en clorar las aguas que van a ser potabilizadas para sus diferentes usos; esta actividad afecta los microecosistemas acuáticos severamente al bajar los niveles de pH por debajo de 6.

Los resultados de los ensayos realizados con colchicina muestran que Corbicula fluminea resulta más resistente que el mejillón Mytilus californianus. En el mejillón el efecto es inmediato, presentando deformaciones en la porción terminal de los cilios, con estructuras en forma de palillo de tambor o bastón y otros daños. Otro tipo de anormalidades que se presentó en el mejillón, fue la disminución del movimiento y el acortamiento de los cilios. A diferencia de lo que ocurre con la almeja donde los daños se manifiestan de manera distinta: no ocurren deformaciones en la porción terminal de los cilios, y el daño se manifiesta en un plazo mayor.

El fungicida benomil presenta efectos más rápidos y drásticos en Mytilus californianus que en Corbicula fluminea; ya que en una concentración de 2.56 ng/ml los efectos aparecen a las 2 horas, a diferencia de la almeja que los efectos aparecen hasta las 18h. El tipo de daño registrado en cilios son: forma de palillo de tambor o bastón, disminución del movimiento y pérdida de cilios. Otros daños adicionales registrados a causa del benomil fueron modificación en la textura de la branquia, despigmentación y aumento en la turbidez del medio. Estas texturas y despigmentaciones así como el aumento en la

turbidez del medio no aparecen durante los ensayos realizados con colchicina

El fenómeno de "acamamiento" citado por Márquez (1993) haciendo alusión al fenómeno que ocurre en los trigales donde las plantas se caen por acción de un ventarrón; se observó en la branquia del mejillón en numerosos campos. Ninguna modificación o cambio relacionado con este fenómeno de "acamamiento" se detectó en cultivo de branquia de almeja utilizando colchicina o benomil.

En lo referente a Concentración Letal Media, se requiere una concentración de 500 µg/ml para ocasionar la muerte a más del 50 % de los organismos en plazos de 2 a 3 días y a partir del tercer día, la mortalidad es masiva. Para demostrar que los organismos realmente murieron, se aplicó un baño de recuperación a las almejas sobrevivientes. Ninguno tuvo capacidad de respuesta a estímulos mecánicos y por tanto se consideraron muertos.

La utilidad de los experimentos in vitro resulta evidente puesto que la toxicidad del benomil, se demuestra al aplicarse a las dos especies, en las que los daños se manifestaron en menos de 24 horas. A diferencia de cuando se aplica in vivo en donde se necesitan concentraciones de 500 µg/ml para causar la muerte al 50 % de los organismos.

Para finalizar, conviene hacer incapié en que la utilización de la almeja Corbicula fluminea como organismo experimental en Toxicología, utilizando el cultivo de tejidos resulta sencillo, económico, confiable y rápido.

## CONCLUSIÓN

1. El factor ambiental de temperatura no afecta las características de evaluación (movimiento ciliar, forma de los cilios, tamaño y textura) de los cultivos de branquias.
2. El medio fisiológico de Benex, funciona adecuadamente en el cultivo de branquias, por lo que puede utilizarse como testigo negativo durante los ensayos de toxicidad.
3. Los niveles de pH de 6 hasta 9 no interfieren la actividad ciliar de los cultivos de branquias.
4. Los niveles de pH bajos y altos (4, 5, 10, 11.5) afectan de manera evidente la actividad ciliar de las branquias en los cultivos.
5. La almeja Corbicula es mas resistente a la colchicina que el mejillón Mytilus en cultivo de branquias.
6. El mejillón Mytilus es menos resistente al benomil que la almeja Corbicula en cultivo de branquias.

7. Concentraciones de 500 µg/ml de benomil son suficientes para matar al 50 % de las almejas en un plazo de 48 a 72 horas.
8. La almeja Corbicula fluminea es un organismo que puede utilizarse como centinela o indicador en ensayos de toxicidad in vitro e in vivo en ambientes dulceacuicolas.
9. El fungicida benomil provoca daños en las branquias del mejillón Mytilus en ensayos in vitro y también en la almeja Corbicula en ensayos in vitro e in vivo.

## BIBLIOGRAFÍA

**Albert, A. L. y A. G. Molina. 1988a** Sustancias ambientales y sustancias xenobióticas. En: curso básico de toxicología ambiental. L. A. Albert compiladora. Limusa. México.

**Albert, A. L. y A. G. Molina. 1988b** Contaminación y ecosistemas. En: curso básico de toxicología ambiental. L. A. Albert compiladora. Limusa. México.

**Albert, L. A. 1990.** Riesgos de los plaguicidas para la salud. En: Los plaguicidas, el ambiente y la salud. L. A. Albert compiladora. Centro de Ecodesarrollo. México.

**Albert, L. A. y L. G. Alpuche. 1990.** Riesgos de los plaguicidas para el ambiente. En: Los plaguicidas, el ambiente y la salud. L. A. Albert compiladora. Centro de Ecodesarrollo. México.

**Alpuche, L. G. 1990.** Los carbamatos. En: Los plaguicidas, el ambiente y la salud. L. A. Albert compiladora. Centro de Ecodesarrollo. México.

**Alpuche, L. G. 1990.** Los fungicidas, aspectos generales. En: Los plaguicidas, el ambiente y la salud. L. A. Albert compiladora. Centro de Ecodesarrollo. México.

**Alpuche, L. G. 1990.** Los fungicidas orgánicos. En: Los plaguicidas, el ambiente y la salud. L. A. Albert compiladora. Centro de Ecodesarrollo. México.

**Alia, M.; E. Labarda y F. A. Antón. 1992.** Mutagenecity, carcinogenecity as related to teratogenic activity. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 48:275-281.

- Araujo, R.; D. Moreno y M. A. Ramos. 1993.** The asiatic clam Corbicula fluminea (Müller, 1774) (Bivalvia: Corbiculidae) in Europe. American Malacological Bull. 10(1):39-49.
- Ariëns, E. J.; P. A. Lehmann y A. M. Simonis. 1978.** Introducción a la toxicología general. Diana. México.
- Bárcenas, P. C. y L. A. Albert. 1990.** Conceptos básicos de toxicología. En: Los plaguicidas, el ambiente y la salud. L. A. Albert compiladora. Centro de Ecodesarrollo. México.
- Belanger, E. S.; J. L. Farris; D. S. Cherry y J. Cairns Jr. 1985.** Sediment preference of the freshwater asiatic clam, Corbicula fluminea. The Nautilus. 99(2-3): 66-73.
- Britton, J. C. y B. Morton. 1979.** Corbicula in North America: The evidence reviewed and evaluated. Proceeding, First Inter. Corbicula Symposium. Ed. J. C. Britton. Forth Worth, TX. 249-287.
- Brown, W. V. y M. Bertke. 1979.** Citología. Omega.
- Burch, J. Q. 1944.** Checklist of West American Mollusk. Family Corbiculidae. Min. Conchol. South. Calif. 36:18.
- Cherry, D. B.; J. Jr. Cairns y R. L. Graney. 1980.** Asiatic clam invasion: causes and effects. Water Spectrum. 12: 18-24.
- Coronado, B. B. 1981.** Folleto desplegable s/n de jefatura de Distrito de Riego No. 14 en Mexicali, B.C.. SARH. Febrero.
- Cortinas de Nava, C. 1988.** Carcinogénesis ambiental. En: Curso básico de toxicología ambiental. L. A. Albert compiladora. Limusa. México.
- Cortinas de Nava, C.; J. Espinoza; S. Vega; P. Ostrosky e I. Jiménez. 1984.** Genotoxicidad de farmacos. En: Avances en el mecanismo de acción de farmacos. Contreras, C. M.; C. Cortinas de Nava; L. A. Barragan, compiladores. Masson. México.

**Cortinas de Nava, C.; P. Otrosky de Wegman y S.C. Galvan. 1985.** Principios de mutagenesis y su relación con carcinogenesis y teratogenesis. Departamento de Biología del Desarrollo. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

**Counts, C. L. III. 1981.** Corbicula fluminea (Bivalvia: Spheriacea) in British Columbia. *The Nautilus*. 95: 12-13.

**Counts, C. L. III y R. S. Prezant. 1979.** Shell structure and histochemistry of mantle of Corbicula leana (Prime, 1884) (Bivalvia: Spheriacea). *American Zool.* 1981: 7.

**Cremlyn, R. 1992.** Plaguicidas modernos y su acción moderna. Limusa. México.

**Fernícola, N. A. G. G. y P. Jauge. 1985.** Nociones básicas de toxicología. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. México.

**Ferrando, M. D.; V. Alarcón; A. Fernández-Casalderrey, M. Gamón; y E. Andreu-Moliner. 1992.** Persistence of some pesticides in the aquatic environment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48:747-755.

**Fitch, J. E. 1953.** Corbicula fluminea in Imperial Valey. *Mi. Conchol. South. Calif.* 130: 9-10.

**Giese A. Ch., 19??.** Fisiología celular y general. Interamericana. México.

**Gutiérrez Galindo, E. A. 1982.** Comentario sobre el metabolismo de metales pesados en organismos marinos. *Ciencias Marinas*. 8(1): 134-138.

**Hillis, D. M. y R. L. Mayden. 1985.** Spread of the asiatic clam Corbicula (Bivalvia: Corbiculacea) in to the new world tropics. *Southwestern Naturalist*. 30: 454-456.

**Horne, F. R. y S. McIntosh. 1979.** Factors influencing distribution of mussels in the Blanco River of central Texas. *The Nautilus*. 91: 54-59.

**INEGI, 1997.** Censos de Población y Vivienda 1995.

**Ituarte, C. F. 1994.** Corbicula and Neocorbicula (Bivalvia: Corbiculidae) in the Paraná, Uruguay and Río de la Plata basins. *The Nautilus*. 107(4):129-135.

**King, C. A.; C. J. Langdon y C. L. Counts III. 1986.** Spawning and early development of Corbicula fluminea (Bivalvia: corbiculidae) in laboratory culture. *American Malacological Bull.* 4(1): 81-88.

**Kraemer, L. R. 1978.** Corbicula fluminea (Bivalvia: Spheriacea): the functional morphology of its hermafroditism. *Bull. Am. Malacol. Union, Inc.* 40-49.

**Kraemer, L. R. y M. L. Galloway. 1986.** Larval development of Corbicula fluminea (Müller) (Bivalvia: Corbiculidae): an appraisal of its heterochrony. *Am. Malacol. Bull.* 4: 61-69.

**Leynaud, G. 1979.** Efectos tóxicos de la polución sobre la fauna piscícola. En: *La contaminación de las aguas continentales*. P. Pesson compilador. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.

**Loera, R. y L. A. Albert. 1990.** La contaminación y el desarrollo de los plaguicidas sintéticos. En: *Los plaguicidas, el ambiente y la salud*. L. A. Albert compiladora. Centro de Ecodesarrollo. México.

**Loera, R. y L. A. Albert. 1990.** Los plaguicidas y criterios de riesgo. En: *Los plaguicidas, el ambiente y la salud*. L. A. Albert compiladora. Centro de Ecodesarrollo. México.

**Loera, R. 1990.** Fuentes de información sobre plaguicidas. En: *Los plaguicidas, el ambiente y la salud*. L. A. Albert compiladora. Centro de Ecodesarrollo. México.

**Loera, R. 1990.** Clasificaciones más importantes de los plaguicidas. En: *Los plaguicidas, el ambiente y la salud*. L. A. Albert compiladora. Centro de Ecodesarrollo. México.

**Loera, R.; L. A. Albert y R. Chediack. 1990.** El balance riesgo-beneficio del uso de plaguicidas. En: *Los*

plaguicidas, el ambiente y la salud. L. A. Albert compiladora. Centro de Ecodesarrollo. México.

**Márquez y Becerra, C. 1993.** Obtención de un modelo animal para la investigación de mutagénesis en el ambiente marino. Tesis Doctoral en Ciencias (Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

**Mathew, P. y N. R. Menon. 1992.** Toxic responses of bivalves to metal mixtures. Bull. Environ. Contamin. Toxicol. 48:185-193.

**McMahon, R. F. 1983.** Ecology of an invasive pest bivalve, Corbicula. En: The Mollusca, Vol. 6, Ecology. Ed. Wilbur.

**McMahon, R. F. 1991.** Mollusca: Bivalvia. P 315-399. En: Ecology and classification of North American freshwater invertebrate. Ed. Thorp, J. H. y A. P. Covich. Academic Press.

**Morton, B. 1977.** The populations dynamics of Corbicula fluminea (Bivalvia: Corbiculacea) in Plover Cove Reservoir, Hong Kong. J. Zool.. 181: 21-42.

**Morton, B. 1986.** Corbicula in Asia: an updated synthesis. American Malacological Bull., Special Edition No. 2:113-124.

**Nagao M. y T. Sugimura. 1978.** Environmental mutagens and carcinogens. Ann. Review Genetics. 12:117-159.

**Newell, N. D. 1969.** Classification of Bivalvia. En: Treatise of invertebrate paleontology; part N, Mollusca 6. Ed. Moore, R. C.. Geol. Soc. Am, Boulder, Colorado. 205-224.

**OPS-OMS. 1980.** Criterios de salud ambiental 6, principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Parte I. Washington, D.C., E.U.A. Pubscient.

**Pérez Bastidas, D. y J. A. Sánchez Navarro. 1983.** Ordenamiento ecológico del Valle de Mexicali. Estudios Fronterizos, Instituto de Investigaciones sociales. Año 1, No. 1, mayo-agosto, 113-152.

**Pomares, L. G.. 1990.** Eliminación de recipientes y excedentes de plaguicidas. En: Los plaguicidas, el ambiente y la salud. L. A. Albert compiladora. Centro de Ecodesarrollo. México.

**Pramod S. T.;S. G. Sawant y R. R. Dalvi. 1993.** Benomyl toxicity in chickens. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50:817-822.

**Rankin, P. W.; J. G. Surak y N. P. Thompson. 1977.** Effect of benomyl and benomyl hydrolysis products on tetrahymena pyriformis. Fd. Cosmet. Toxicol. 15:187-193.

**Rendon, von Osten y L. A. Albert. 1990.** Efectos tóxicos a largo plazo de los plaguicidas. En: Los plaguicidas, el ambiente y la salud. L. A. Albert compiladora. Centro de Ecodesarrollo. México.

**Restrepo, I. 1992.** Los plaguicidas en México. Comisión Nacional de Derechos Humanos. México.

**Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1975.** Estudios Geohidrológicos.

**Sinclair, R. M. 1971.** Annotated bibliography on exotic bivalve Corbicula in North America. Sterkiana. 43: 11-18.

**Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1981.** Biometry:the principles and practice of statistics in biological research.2<sup>da</sup> Ed. W. H. Freeman Company. San Francisco, CA.

**Thompson, R. 1969.** Tidal Flat Sedimentation on the Colorado River Delta, North Western Gulf of California. The Geological Society of America.

**Vega, S. y J. Reynaga. 1990.** Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Limusa. México.