

ARTÍCULO

## Bioacumulación y toxicidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos en moluscos bivalvos del Pacífico colombiano

### Bioaccumulation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalve molluscs of the colombian Pacific

Fecha recepción: 2010-01-27 / Fecha aceptación: 2010-11-03

**Mónica María Zambrano Ortiz**, monyazambrano@yahoo.com  
Programa de Ciencias Biológicas. Centro de Investigaciones Marinas,  
Universidad de la Habana. La Habana, Cuba

**Robinson Casanova Rosero F.**, rcasanova@dimar.mil.co  
Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Pacífico – CCCP.  
Vía al Morro, Capitanía de Puerto, San Andrés de Tumaco, Colombia

**Arecibia Carballo C.**, garen04@gmail.com  
Centro de Investigaciones Pesqueras, Jaimanitas. La Habana, Cuba.

**Vidal Novoa A.** alexis.vidal@infomed.sld.cu  
Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.



#### RESUMEN

En el presente estudio se determinó la bioacumulación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) presentada por las especies de moluscos bivalvos *Anadara tuberculosa* y *Anadara similis*. Se realizaron pruebas con una mezcla de los 16 HAP considerados contaminantes prioritarios por la Environmental Protection Agency (EPA), suministrados a bajas concentraciones, establecidas a partir de los niveles considerados seguros para la vida acuática por normativas internacionales. Se registraron los máximos de acumulación en *Anadara tuberculosa* (4,8 ppm) y *Anadara similis* (7,5 ppm) transcurridos 30 y 25 días de exposición respectivamente, evidenciándose una aparente mayor capacidad de asimilación por parte de la segunda especie.

**Palabras claves:** Bioacumulación, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), bivalvos, *anadara tuberculosa*, *anadara similis*.

#### ABSTRACT

This study, determines the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the species of bivalve mollusks *Anadara tuberculosa* and *Anadara similis*. Tests were conducted with a mixture of 16 PAHs considered priority pollutants by the Environmental Protection Organism (EPA), supplied at low concentrations, established from the levels considered safe for aquatic life by international standards. The maximum accumulation values were recorded for *Anadara tuberculosa* (4.8 ppm) and *Anadara similis* (7.5 ppm) after 30 and 25 days of exposure, respectively, showing thereby apparently higher capacity of assimilation by the second species.

**Key words:** Bioaccumulation, polycyclic aromatic hydrocarbons - PAHs, bivalves, *anadara tuberculosa*, *anadara similis*.

## INTRODUCTION

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are natural constituents of crude oil, forming a fraction of up to 20% of total hydrocarbons, while potentially being the most toxic group [1].

Part of the PAHs present in the marine environment are caused by natural processes [2] of a biogenic sort, being synthesized by microorganisms, plankton, benthic algae and fish [3]. The main source of these compounds are man - made activities, which have contributed to the overall increase in mergers in the last 100 years [2].

More than 100 PAHs are recognized by the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) and only 16 are considered on the basis of their industrial, environmental and toxicological importance [4], their harmful effects since they are enhancers of genetic disorders and cancer. PAHs are characterized by their persistence and are in the list of priority pollutants by U.S. EPA [5,6,7], the European Community, the Organism For Toxic Substances And Disease Registry [8] and the International Organism for Research on Cancer [9]. For all the reasons above, PAHs are compounds of interest in studies related to environmental quality and human health.

Mutagenic pollutants in natural environments are predominantly secondary effects of industrial processes [10, 11], and PAHs rank among the most common persistent organic pollutants in aquatic environments [12], including estuaries[13]. Additionally, PAHs cause long - term biological effects, and toxicity to aquatic organisms increases with exposure to solar radiation due to photoactivation of molecules [14,15,16].

Bivalve species from the *Anadara tuberculosa* and *Anadara similis* were exposed in this study to a mixture of these compounds, so as to monitor the process of bioaccumulation and the differences in holding capacity by both species after a certain period of time.

## METHODOLOGY

Bioaccumulation tests consisted of exposing 110 organisms of each species (10 per test vessel) at low con-

centrations of the mixture of the 16 PAHs of interest (table 1), in order not to cause mortality during the period of exposure. Prior to the initiation of the test, organisms were subjected to a period of acclimation in the laboratory for 10 days; during this time physical and chemical parameters with a 24 - hour periodicity were recorded.

The physicochemical parameters monitored are: salinity (S ‰), pH, temperature (°C), dissolved oxygen (mgO<sub>2</sub>/L) and electrical conductivity (µS/cm). DO must not fall from 2.0 mg / L, salinity should not show changes greater than 5‰ in 24 hours, and changes in temperature cannot vary any more than 3°C for the same period of time [17].

Two bioaccumulation tests were conducted exposing in each organisms of the species *Anadara tuberculosa* and *Anadara similis*, using acetone as solvent and performing parts of the total volume of water in test vessels with 24 - hour intervals, as aeration supply results in a loss of some compounds, and therefore a decrease in the concentration of the mixture. For this reason the tests conducted were of a semi - static sort.

The average size for organisms of the *A. tuberculosa* species was 4.88 cm TL (between 3.6 cm - 6.5 cm) in the case of *A. similis*, this value was equivalent to 4.48 cm TL (between 3.5 cm - 5.7 cm).

Two types of controls were used; a blank control (seawater only) and another control with an addition of solvent. In the latter, organisms were exposed to 15 mL of acetone (volume corresponding to the value added in the solution); each control was placed in three containers (an original with two replicates each).

Concentrations used in the first test were equivalent to half the reference "safe" concentration [18]. Only fluorene was provided at a level above the reference ( $1.5 \times 10^{-2}$  ppm) in order to increase the concentration of the solution, starting from the safe concentration for this compound established by the U.S. EPA [19], corresponding to  $1.4 \times 10^{-2}$  ppm. For compounds which do not have a baseline in this guideline, it was decided to set it as prescribed for anthracene, as it has the largest restriction amongst the compounds appertaining to this group.

## INTRODUCCIÓN

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) son constituyentes naturales del petróleo crudo, conformando una fracción de hasta el 20% del total de hidrocarburos, siendo a la vez el grupo potencialmente más tóxico [1].

Una parte de los HAP presentes en el medio marino tienen su origen en procesos naturales [2] de tipo biogénico, siendo sintetizados por los microorganismos, el plancton, las algas bentónicas y los peces [3]. La fuente principal de estos compuestos son las actividades realizadas por el hombre, las cuales han contribuido al incremento general de las concentraciones en los últimos 100 años [2].

Más de 100 HAP son reconocidos por la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) y solo 16 son considerados en función de su importancia industrial, ambiental y toxicológica [4], por sus efectos perjudiciales al ser potenciadores de desordenes genéticos y cáncer; se caracterizan por su persistencia y se encuentran en la lista de contaminantes prioritarios de la US EPA [5,6,7], la Comunidad Europea, la *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* [8] y la *International Agency for Research on Cancer* [9]. Por lo que se constituyen en compuestos de interés en estudios relacionados con la calidad ambiental y con la salud humana.

Los contaminantes mutagénicos en ambientes naturales son efecto predominantemente secundario de procesos industriales [10,11], estando los HAP entre los más comunes contaminantes orgánicos persistentes en ambientes acuáticos [12] incluyendo estuarios [13]. Causan efectos biológicos a largo plazo y su toxicidad sobre organismos acuáticos se incrementa con la exposición a la radiación solar, por fotoactivación de las moléculas [14,15,16].

En el presente estudio se expusieron moluscos bivalvos de las especies *Anadara tuberculosa* y *Anadara similis* a una mezcla de estos compuestos, con el fin de realizar un seguimiento al proceso de bioacumulación y a las diferencias en cuanto a capacidad de retención presentada por ambas especies transcurrido un determinado periodo de tiempo.

## METODOLOGÍA

Las pruebas de bioacumulación consistieron en exponer 110 organismos de cada especie (10 por recipiente de ensayo) a bajas concentraciones de la mezcla de los 16 HAP de interés (tabla 1), con el fin de no generar mortalidad durante el periodo de exposición. Previo inicio de las pruebas los organismos fueron sometidos a un periodo de aclimatación en el laboratorio durante 10 días, registrando parámetros fisicoquímicos con periodicidad de 24 horas.

Los parámetros fisicoquímicos a los que se hace seguimiento son: salinidad (S‰), pH, temperatura (°C), oxígeno disuelto (mgO<sub>2</sub>/L) y conductividad eléctrica (μS/cm). El OD no debe descender de 2,0 mg/L, la salinidad no debe presentar cambios mayores a 5‰ en 24 horas, y los cambios de temperatura no pueden oscilar más de 3°C para este mismo periodo de tiempo [17].

Se realizaron dos pruebas de bioacumulación exponiendo en cada una de ellas a organismos de las especies *Anadara tuberculosa* y *Anadara similis*, empleando acetona como solvente y realizando recambios del volumen total del agua contenida en los recipientes de ensayo con periodicidad de 24 h; pues el suministro de aireación genera pérdida de algunos compuestos, y por tanto una disminución en la concentración de la mezcla, por tal razón las pruebas realizadas fueron tipo semiestático.

La talla media para los organismos de la especie *A. tuberculosa* fue de 4,88 cm de LT (entre 3,6 cm – 6,5 cm), en el caso de *A. similis* esta fue de 4,48 cm de LT (entre 3,5 cm – 5,7 cm).

Se emplearon dos tipos de controles, un blanco (solo agua marina) y otro con adición del solvente, en este ultimo los organismos fueron expuestos a 15 mL de acetona, volumen correspondiente al añadido en la solución; a cada control se asignaron tres recipientes (un original con sus dos réplicas respectivas).

Las concentraciones empleadas en la primera prueba fueron equivalentes a la mitad de la concentración "segura" de referencia [18], solo el fluoreno se proporcionó en un nivel superior al referenciado (1,5x10<sup>-2</sup> ppm) con el

**Table 1.** Composition of the HAP mixture used in the toxicity test (ppm).

Composed	Essay 1	Essay 2	Directives*
Antraceno	$6 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-5}$
Pireno	$1,25 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$
Benzo[k]fluoranteno	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	
Benzo[ghi]perileno	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	
Benzo[a]pireno	$7,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-5}$
Benzo[b]fluoranteno	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	
Benzo[a]antraceno	$9 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-5}$
Indeno[1,2,3-cd]pireno	$5 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-6}$	
Dibenzo[ah]antraceno	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	
Fluoranteno	$2 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-5}$
Criseno	$1,25 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$	
Naftaleno	$5,5 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,4^{**} \times 10^{-3}$
Acenaftileno	$2,5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-3}$	
Acenafteno	$2,9 \times 10^{-3}$	$5,8 \times 10^{-3}$	$5,8 \times 10^{-3}$
Fluoreno	$1,5 \times 10^{-2}$	$3 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-3}$
Fenantreno	$2 \times 10^{-3}$	$4 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$
Concentración de ensayo	0,0212425	0,01548	

\*Directives of water quality to the protection of the aquatic life. Fuente: [18].

\*\*Established directives for marine water. Fuente: [18].

For the second test, the concentration of PAHs delivered corresponds to the reference levels. Only Indend [1,2,3-cd] pyrene maintained the previously set concentration, given its high toxicity.

Algae (diatoms) were supplied every 24 hours in 1L volumes per unit and in average density of 30,000 cel / mL, grown in the laboratory from cells taken from the natural environ.

In each test, a total of 120 organisms per species were exposed to the mixture of PAH, 30 organisms of each species were allocated to each one of the controls

used (blank control and acetone – added control).

A survey period of 60 days was established for the first test, with sampling at 0, 15 and 45 days in order to observe the process of incorporation of PAHs by organisms and adjust the sampling ranges from this information for more detailed monitoring.

For the second test, organisms were sampled with 5 – day intervals during a trial period of 60 days.

Test development was based on the methodology described in the Regional Course documents CPPS / UNEP / IOC / FAO [17] and Standard Methods [20], while determination of PAHs was carried out following the methodologies described in the Analytical Method for the determination of Individual (n - alkanes and isoprenoids) and Total Petroleum Hydrocarbons (TPH), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Biomarker Triterpanes and Steranes in Oil and Oil – Spill - Related Environmental Samples - Water and Particulates Soils / Sediments - [21].

## OUTCOME

During the tests, both species had a high mortality rate.

In the first test, *A. similis* had total mortality in the blank control container; mortality occurred between days 7 and 18 after the initiation of the test. Solvent -exposed organisms had a mortality rate of 70% which occurred between days 5 and 13 after the initiation of the test, whilst the subjects exposed to the mixture reached 71% mortality over a period of 22 days, period after which mortality ceased completely. The test for this species comprised 45 days and, because of the high mortality rate, only two samples were taken during the test period (day 15 and day 45).

*A. tuberculosis* showed a 35% mortality in organisms exposed to the mixture between 2 and 29 days after the test started, 20% in those exposed to solvent on days 16 and 22, while the organisms of the blank control had a mortality rate of 70% between days 13 and 33. Of the total of organisms exposed in this first test, only three specimens was an "anomaly" found, which may be associated with (apparently) possible hydropic vesicles

fin de incrementar la concentración de la solución, partiendo de la concentración segura para este Compuesto, establecida por la U.S. EPA [19], correspondiente a  $1,4 \times 10^{-2}$  ppm. Para los compuestos que no cuentan con un nivel de referencia en esta guía, se estableció, fijarla a la estipulada para el antraceno, ya que éste cuenta con la mayor restricción entre los compuestos que pertenecen a este grupo.

**Tabla 1.** Composición de la mezcla de HAP utilizada en las pruebas de toxicidad (ppm).

Compuesto	Ensayo 1	Ensayo 2	Directrices*
Antraceno	$6 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-5}$
Pireno	$1,25 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$
Benzo[k]fluoranteno	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	
Benzo[ghi]perileno	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	
Benzo[a]pireno	$7,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-5}$
Benzo[b]fluoranteno	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	
Benzo[a]antraceno	$9 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-5}$
Indeno[1,2,3-cd]pireno	$5 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-6}$	
Dibenzo[ah]antraceno	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	
Fluoranteno	$2 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-5}$
Criseno	$1,25 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$	
Naftaleno	$5,5 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,4^{**} \times 10^{-3}$
Acenaftileno	$2,5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-3}$	
Acenafteno	$2,9 \times 10^{-3}$	$5,8 \times 10^{-3}$	$5,8 \times 10^{-3}$
Fluoreno	$1,5 \times 10^{-2}$	$3 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-3}$
Fenantreno	$2 \times 10^{-3}$	$4 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$
Concentración de ensayo	0,0212425	0,01548	

\*Directrices de calidad del agua para la protección de la vida acuática. Fuente: [18].

\*\*Concentración establecida para agua marina. Fuente: [18].

Para la segunda prueba la concentración de HAP suministrada corresponde a los niveles de referencia, sólo el Indeno[1,2,3-cd]pireno mantuvo la concentración empleada previamente, dada su alta toxicidad.

Se suministraron algas (diatomeas) cada 24 horas en volúmenes de 1L por recipiente y con una densidad promedio de 30.000 cel/mL, cultivadas en laboratorio a partir de células obtenidas del medio natural.

En cada prueba, un total de 120 organismos por especie fueron expuestos a la mezcla de HAP, 30 organismos de cada especie se destinaron a cada uno de los controles empleados (blanco, y el que contenía acetona).

Para la primera prueba se planteó un período de ensayo de 60 días, con toma de muestras a 0,15 y 45 días, para observar el proceso de incorporación de los HAP por parte de los organismos y ajustarlos a partir de esta información los intervalos de toma de muestra para realizar un seguimiento más detallado.

Para la segunda prueba se tomaron muestras de organismos con periodicidad de cinco días, durante un período de prueba de 60 días.

El desarrollo de los ensayos se basó en la metodología descrita en los documentos del Curso Regional CPPS/PNUMA/COI/FAO [17] y en el Standard Methods [20], mientras que la determinación de los HAP se realizó siguiendo la metodologías descritas en el Analytical Method for the determination of Individual (n-alkanes and Isoprenoids) and Total Petroleum Hydrocarbons (TPH), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Biomarker Triterpanes and Steranes in Oil and Oil-Spill-Related Environmental Samples - Water Particulates and Soils/Sediments - [21].

## RESULTADOS

Durante las pruebas realizadas, ambas especies presentaron una alta tasa de mortalidad.

En la primera prueba *A. similis* registró mortalidad total en el recipiente control o blanco, mortalidad presentada entre los días 7 y 18 de iniciada la prueba. Los organismos expuestos al solvente tuvieron una mortalidad del 70% la cual se presentó entre los días 5 y 13, mientras que los expuestos a la mezcla alcanzaron una mortalidad del 71% en un período de 22 días, a partir del cual, la misma cesó totalmente. La prueba para esta especie abarcó 45 días y debido a la alta tasa de mortalidad solo se tomaron dos muestras durante el período de prueba (15 y 45 días).

*A. tuberculosa* presentó un 35% de mortalidad en or-



(figure 1). The number of organisms which delivered this response was not significant, with only two organisms of the species *A. similis* (1.4% after 8 days of exposure) and one of *A. tuberculosa* (0.77% after 24 days). In the second test, organisms did not have this type of alteration. However, there was one specimen (*A. similis*) with this condition during the acclimation period. This specimen died soon thereafter (during the acclimation period); it remains clear that organisms which have this disorder have a low viability and a low probability of survival, because even if kept under controlled conditions in terms of physicochemical parameters, with constant aeration and supply food, the organism failed to overcome this condition.



**Figure 1.** Anomalia presentada por un organismo de la especie *Anadara similis* (derecha), luego de una exposición de 8 días a la mezcla de HAP.

The physicochemical parameters were stable, temperature ranged between 23.3 and 25.7°C, pH between 7.1 and 7.9 units of pH, salinity between 26.0 and 26.3 ‰, and Dissolved Oxygen between 7.5 and 7.8 mg O<sub>2</sub>/L.

In the second test, mortality in organisms from the blank - control container reached 33.33% for *A. tuberculosa* and 53.33% for *A. similis* (out of 30 organisms - 10 per test vessel). The containers wherein acetone was added had a mortality rate corresponding to 56.66% and 66.66% for *A. tuberculosa* and *A. similis*, respectively.

In organisms exposed to the mixture of PAHs, mortality occurred in 87 organisms of the species *A. tuberculosa* and 97 of *A. similis*, which corresponds to 43.5% and 48.5% of exposed organisms per species.

The levels of compounds accumulated during the first test are presented in table 2, while those achieved during the second test are listed in tables 3 and 4. In both tests it was observed that there exists a tendency to present lower concentrations of compounds which have a higher molecular weight (MW) (figures 2, 4 and 5), being the acenaphthene and fluorene the elements which recorded highest concentration (figures 3, 4 and 5).

## DISCUSSION

The concentrations to which species were exposed showed that the lowest concentration of the mixture ( $1.548 \times 10^{-2}$  ppm) generated higher mortality, which is not surprising if one considers that the concentration of most compounds was duplicated in relation to the first test. Concentration of PAHs in the first test was higher because of the supply of fluorene at levels exceeding those set out in the water quality guidelines for protecting aquatic life in Canada [18].

The behavior of mortality in the trials may be associated with greater sensitivity of exposed organisms, since not only did mortality occur in vessels containing the mixture of PAH, but also in the two types of control vessels.

The occurrence of mortality in control containers ensures the presence of a factor other than the mixture which exerted a negative influence at this level; this fact is likely to be related to the acclimation period, taking into account that in bioaccumulation tests with these species, wherein the period did not exceed five days, no mortality data were recorded in the control containers or in those that were exposed to the toxic organisms of interest [21,22,23].

ganismos expuestos a la mezcla entre el día 2 y el 29 de iniciada la prueba, 20% en los expuestos al solvente en los días 16 y 22, mientras que los organismos del blanco o control alcanzaron una mortalidad del 70% entre los días 13 y 33. Del total de organismos expuestos en esta primera prueba, solo en tres ejemplares se observó una "anomalía", que puede estar asociada (en apariencia) a posibles vesículas hidrópicas (figura 1). La cantidad de organismos que presentaron esta respuesta no fue significativa, con solo dos organismos de la especie *A. similis* (1,4% tras 8 días de exposición) y uno de *A. tuberculosa* (0,77% luego de 24 días). En la segunda prueba no se observaron organismos con este tipo de alteración, sin embargo, se presentó un ejemplar (*A. similis*) con esta condición durante el periodo de aclimatación. Este individuo pereció rápidamente (durante el período de aclimatación), siendo claro que los organismos que presentan esta afectación tienen una baja viabilidad y una baja probabilidad de supervivencia, pues pese a mantenerse bajo condiciones controladas en cuanto a parámetros fisicoquímicos, con aireación constante y suministro de alimento, el organismo no logró sobreponerse a esta condición.



**Figura 1.** Anomalía presentada por un organismo de la especie *Anadara similis* (derecha), luego de una exposición de 8 días a la mezcla de HAP.

Los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron estables, la temperatura osciló entre 23,3 y 25,7 °C, el pH entre 7,1 y 7,9 unidades de pH, la salinidad entre 26,0 y 26,3 ‰, y el oxígeno disuelto entre 7,5 y 7,8 mg O<sub>2</sub>/L.

En la segunda prueba la mortalidad en organismos del recipiente de control – blanco alcanzó un 33,33% para *A. tuberculosa* y un 53,33% para *A. similis* (de un total de 30 organismos - 10 por recipiente de ensayo). En

los recipientes que se adicionó acetona, se registró una mortalidad correspondiente al 56,66% y de 66,66% para *A. tuberculosa* y *A. similis*, respectivamente.

En los organismos expuestos a la mezcla de HAP, la mortalidad fue de 87 organismos de la especie *A. tuberculosa* y 97 de *A. similis*, que corresponden respectivamente a un 43,5% y 48,5% del total de organismos expuestos por especie.

Los niveles de compuestos acumulados durante la primera prueba se presentan en la tabla 2, mientras que los alcanzados durante la segunda prueba se pueden relacionar en las tablas 3 y 4. En ambas pruebas se evidenció una tendencia a presentar menores concentraciones de aquellos compuestos que tienen un mayor peso molecular (PM) (figuras 2, 4 y 5), siendo el acenafteno y el fluoreno los que registraron una mayor concentración (figuras 3, 4 y 5).

## DISCUSIÓN

Las concentraciones a las que se expusieron las especies de estudio reflejaron que la menor concentración de la mezcla ( $1,548 \times 10^{-2}$  ppm) generó una mayor mortalidad, lo que no es de sorprender si se tiene en cuenta que la concentración de la mayor parte de los compuestos se duplicó con respecto a la primera prueba, en la que la concentración de HAP fue mayor, debido al suministro de fluoreno en niveles superiores a los establecidos en las directrices de calidad del agua para la protección de la vida acuática del Canadá [18].

El comportamiento de la mortalidad en las pruebas puede asociarse con una mayor sensibilidad de los organismos expuestos, ya que no solo se presentó mortalidad en los recipientes que contenían la mezcla de HAP; sino también en los dos tipos de recipientes de control.

El registro de mortalidad en los recipientes de control asegura la presencia de un factor distinto a la mezcla que ejerció una influencia negativa a este nivel; siendo bastante probable que el mismo se relacione con el periodo de aclimatación, teniendo en cuenta que en pruebas de bioacumulación con estas especies, en los que este periodo no superó los cinco días, no se registraron datos de mortalidad en recipientes de control ni en aquellos en que se expusieron los organismos al tóxico de interés [21, 22, 23].

**Table 2.** Concentration of HAP in *Anadara similis* y *Anadara tuberculosa* during the first test of bioaccumulation (ppb, based on dry weight).

Composed	Time (days)	CONCENTRATION							
		<i>Anadara similis</i>			<i>Anadara tuberculosa</i>				
		0	15	45	0	15	30	45	60
Antraceno		0,0	14,0	19,0	0,0	22,0	50,0	11,0	9,85
Pireno		0,0	0,0	0,8	0,0	7,1	6,2	11,0	11,00
Benzo[k]fluoranteno		0,0	3,5	9,6	0,0	3,1	6,9	7,3	5,10
Benzo[ghi]perileno		0,0	1,7	9,1	0,0	1,2	4,9	4,3	3,15
Benzo[a]pireno		0,0	2,4	3,6	0,0	2,9	4,8	6,0	3,15
Benzo[b]fluoranteno		0,0	5,7	12,0	0,0	5,3	8,4	11,0	6,85
Benzo[a]antraceno		0,0	6,0	11,0	0,0	4,5	9,3	7,7	4,20
Indeno[1,2,3-cd]pireno		0,0	2,1	6,1	0,0	1,7	4,0	3,7	2,80
Dibenzo[ah]antraceno		0,0	0,6	3,3	0,0	0,6	2,5	2,2	0,95
Fluoranteno		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
Criseno		0,0	22,0	51,0	0,0	7,6	25,0	16,0	16,00
Naftaleno		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
Acenaftileno		0,0	45,0	1,9	0,0	19,0	68,0	4,4	1,80
Acenafteno		0,0	34,0	183,0	0,0	9,0	142,0	59,0	38,00
Fluoreno		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
Fenantreno		12,0	15,0	5,0	10,0	20,0	6,8	14,0	11,00
Sumatoria HAP		12,0	152,0	315,4	10,0	104,0	338,8	157,6	113,85

**Table 3.** Concentration of HAP in *Anadara tuberculosa* during the second test of bioaccumulation (ppb, based on dry weight).

Composed	Time (days)	CONCENTRATION									Suma-tory* Com-posed
		<i>Anadara tuberculosa</i>									
		0	5	10	15	20	25	30	35	40	
Antraceno	20	102	218	114	193	112	294	155	194	195	1577
Pireno	25	67	185	90	131	98	165	89	151	100	1076
Benzo[k]fluoranteno	1,6	57	111	114	163	122	172	226	99	133	1197
Benzo[ghi]perileno	1,7	40	141	120	118	110	216	155	107	132	1139
Benzo[a]pireno	4,7	32	85	69	129	75	153	142	75	95	855
Benzo[b]fluoranteno	4,3	47	110	109	147	118	172	238	110	139	1190
Benzo[a]antraceno	1,7	54	100	87	158	98	148	175	98	123	1041
Indeno[1,2,3-cd]pireno	19	65	100	205	250	173	308	346	145	224	1816
Dibenzo[ah]antraceno	11	41	137	107	112	96	220	168	113	139	1133
Fluoranteno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
Criseno	0,5	102	141	161	273	173	248	332	150	213	1793
Naftaleno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
Acenaftileno	15	313	201	564	592	364	371	541	530	611	4087
Acenafteno	13	757	347	1236	1212	838	792	1156	1070	1288	8696
Fluoreno	14	440	482	575	629	506	704	637	611	731	5315
Fenantreno	12	324	509	360	407	355	595	444	425	523	3942
Sumatoria HAP	143,5	2441	2867	3911	4514	3238	4558	4804	3878	4646	



**Tabla 2.** Concentración de HAP en *Anadara similis* y *Anadara tuberculosa* durante la primera prueba de bioacumulación (ppb, con base en peso seco).

Compuesto	Tiempo (días)	CONCENTRACIÓN							
		Anadara similis			Anadara tuberculosa				
		0	15	45	0	15	30	45	60
Antraceno		0,0	14,0	19,0	0,0	22,0	50,0	11,0	9,85
Pireno		0,0	0,0	0,8	0,0	7,1	6,2	11,0	11,0
Benzo[k]fluoranteno		0,0	3,5	9,6	0,0	3,1	6,9	7,3	5,10
Benzo[ghi]perileno		0,0	1,7	9,1	0,0	1,2	4,9	4,3	3,15
Benzo[a]pireno		0,0	2,4	3,6	0,0	2,9	4,8	6,0	3,15
Benzo[b]fluoranteno		0,0	5,7	12,0	0,0	5,3	8,4	11,0	6,85
Benzo[a]antraceno		0,0	6,0	11,0	0,0	4,5	9,3	7,7	4,20
Indeno[1,2,3-cd]pireno		0,0	2,1	6,1	0,0	1,7	4,0	3,7	2,80
Dibenzo[ah]antraceno		0,0	0,6	3,3	0,0	0,6	2,5	2,2	0,95
Fluoranteno		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
Criseno		0,0	22,0	51,0	0,0	7,6	25,0	16,0	16,00
Naftaleno		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
Acenaftileno		0,0	45,0	1,9	0,0	19,0	68,0	4,4	1,80
Acenafteno		0,0	34,0	183,0	0,0	9,0	142,0	59,0	38,00
Fluoreno		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
Fenantreno		12,0	15,0	5,0	10,0	20,0	6,8	14,0	11,00
Sumatoria HAP		12,0	152,0	315,4	10,0	104,0	338,8	157,6	113,85

**Tabla 3.** Concentración de HAP en *Anadara tuberculosa* durante la segunda prueba de bioacumulación (ppb, con base en peso seco).

Compuesto	Tiempo (días)	CONCENTRACIÓN									Sumatoria* Compuesto
		Anadara tuberculosa									
		0	5	10	15	20	25	30	35	40	
Antraceno	20	102	218	114	193	112	294	155	194	195	1577
Pireno	25	67	185	90	131	98	165	89	151	100	1076
Benzo[k]fluoranteno	1,6	57	111	114	163	122	172	226	99	133	1197
Benzo[ghi]perileno	1,7	40	141	120	118	110	216	155	107	132	1139
Benzo[a]pireno	4,7	32	85	69	129	75	153	142	75	95	855
Benzo[b]fluoranteno	4,3	47	110	109	147	118	172	238	110	139	1190
Benzo[a]antraceno	1,7	54	100	87	158	98	148	175	98	123	1041
Indeno[1,2,3-cd]pireno	19	65	100	205	250	173	308	346	145	224	1816
Dibenzo[ah]antraceno	11	41	137	107	112	96	220	168	113	139	1133
Fluoranteno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
Criseno	0,5	102	141	161	273	173	248	332	150	213	1793
Naftaleno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
Acenaftileno	15	313	201	564	592	364	371	541	530	611	4087
Acenafteno	13	757	347	1236	1212	838	792	1156	1070	1288	8696
Fluoreno	14	440	482	575	629	506	704	637	611	731	5315
Fenantreno	12	324	509	360	407	355	595	444	425	523	3942
Sumatoria HAP	143,5	2441	2867	3911	4514	3238	4558	4804	3878	4646	

**Table 4.** Concentration of HAP in *Anadara similis* during the second test of bioaccumulation (ppb, based on dry weight).

Composed Time (days)	CONCENTRATION							*Accumulated
	Anadara similis							
	0	5	10	15	20	25	30	
Antraceno	0,7	114	144	145	280	375	194	1252
Pireno	8,7	49	179	204	166	341	221	1160
Benzo[k]fluoranteno	ND	131	93	122	41	122	166	675
Benzo[ghi]perileno	ND	84	55	64	18	82	100	403
Benzo[a]pireno	ND	68	46	56	27	94	89	380
Benzo[b]fluoranteno	ND	95	96	121	56	140	193	701
Benzo[a]antraceno	ND	84	104	120	81	214	206	809
Indeno[1,2,3-cd]pireno	ND	107	83	115	36	136	147	624
Dibenzo[ah]antraceno	ND	83	59	77	24	96	96	435
Fluoranteno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
Criseno	51	159	222	315	176	408	458	1738
Naftaleno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
Acenaftileno	34	135	40	814	1038	1093	645	3765
Acenafteno	ND	504	153	1929	2247	2320	1552	8705
Fluoreno	44	536	425	879	1144	1152	843	4979
Fenantreno	ND	600	678	702	865	932	669	4446
Sumatoria HAP	22,3	2749	2377	5663	6199	7505	5579	

ND= No Detected

\* It does not included previous test (0 days)

The acclimation period increased compared to previous tests, in order for organisms to perform clearance of the PAH levels which they could have incorporated in their natural environ before they were taken.

Complete cessation of mortality was observed in both tests after a certain period of time, this is associated to an adaptive response by organisms in light of higher initial sensitivity. Said sensitivity is enhanced by the presence of the toxic mixture in the medium, which causes rapid response derived from acute effects. This "adaptability" can be compared with the response by the organisms in the environment after the entrance of toxic compounds.

During the first test, three specimens had an "anomaly" which could be associated with hydropic vesicles (figure 1), related to alterations in membrane permeability or cell osmoregulation. This disease is usually generated by the exposure of organisms to the presence of toxic compounds.

The effects generated by the presence of pollutants are associated with impairment of the immune system, lowering the proper activation of defense mechanisms against adverse conditions [24, 25]. These alterations may be more drastic in certain individuals and that differences exist between species and therefore not all organisms react the same way to a certain condition, stimulation or tension.

With regard to bioaccumulation, *A. similis* showed greater capacity for incorporation of HAP, which was evident after 25 days of exposure, when it reached 7.505 ppm compared to a peak of 4.80 ppm in *A. tuberculosa*, after 35 days of exposure. The aforementioned phenomenon can be interpreted as a higher bioaccumulative capacity of the first species, which in turn may be associated with the increased activity recorded, being that its contact with the medium is much higher.

Given that one of the routes of entrance of toxic substances into the organism is the skin, this route of

**Tabla 4.** Concentración de HAP en *Anadara similis* durante la segunda prueba de bioacumulación (ppb, con base en peso seco).

Compuesto	CONCENTRACIÓN							*Acumulado
	Tiempo (días)	Anadara similis						
		0	5	10	15	20	25	
Antraceno	0,7	114	144	145	280	375	194	1252
Pireno	8,7	49	179	204	166	341	221	1160
Benzo[k]fluoranteno	ND	131	93	122	41	122	166	675
Benzo[ghi]perileno	ND	84	55	64	18	82	100	403
Benzo[a]pireno	ND	68	46	56	27	94	89	380
Benzo[b]fluoranteno	ND	95	96	121	56	140	193	701
Benzo[a]antraceno	ND	84	104	120	81	214	206	809
Indeno[1,2,3-cd]pireno	ND	107	83	115	36	136	147	624
Dibenzo[ah]antraceno	ND	83	59	77	24	96	96	435
Fluoranteno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
Criseno	51	159	222	315	176	408	458	1738
Naftaleno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
Acenaftileno	34	135	40	814	1038	1093	645	3765
Acenafteno	ND	504	153	1929	2247	2320	1552	8705
Fluoreno	44	536	425	879	1144	1152	843	4979
Fenantreno	ND	600	678	702	865	932	669	4446
Sumatoria HAP	22,3	2749	2377	5663	6199	7505	5579	

ND= No Detectado

\* No incluye la muestra inicial (0 días)

Los periodos de aclimatación se incrementaron con respecto a pruebas previas, con el fin de que los organismos depuraran los niveles de HAP que pudieran haber incorporado en el medio natural antes de su captura.

El cese total de la mortalidad que se observó en ambas pruebas después de un determinado periodo de tiempo, se asocia a una respuesta de adaptación por parte de los organismos tras una mayor sensibilidad inicial, acentuada por la presencia de la mezcla tóxica en el medio que causa una rápida respuesta derivada de efectos agudos. Esta "adaptabilidad" puede compararse con la respuesta presentada por los organismos en el medio natural tras el ingreso de compuestos tóxicos.

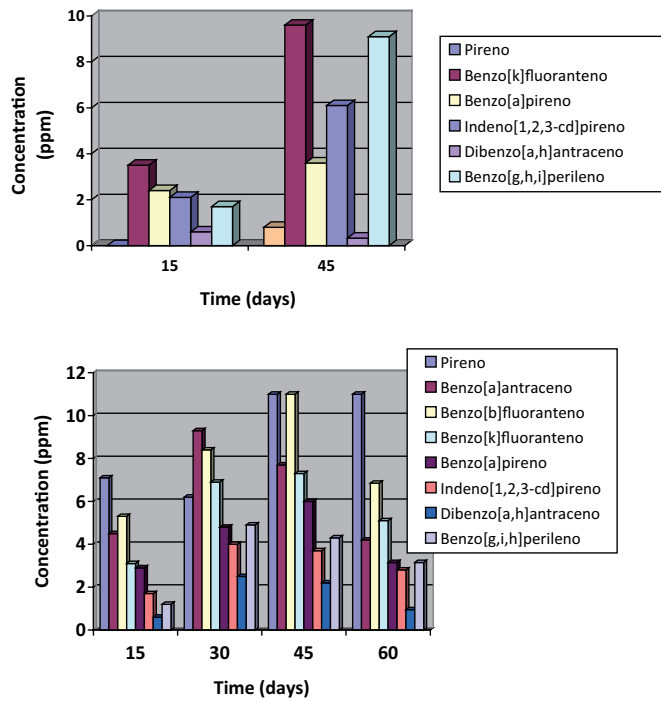
Durante la primera prueba tres ejemplares presentaron una "anomalía", que pudo estar asociada con vesículas hidrópicas (figura 1), relacionadas con alteraciones en la permeabilidad de las membranas o en la osmoregulación celular, patología que suele generarse por la exposición de los organismos a la presencia de compuestos tóxicos.

Los efectos generados por la presencia de contaminantes se asocian con afectación al sistema inmune, lo

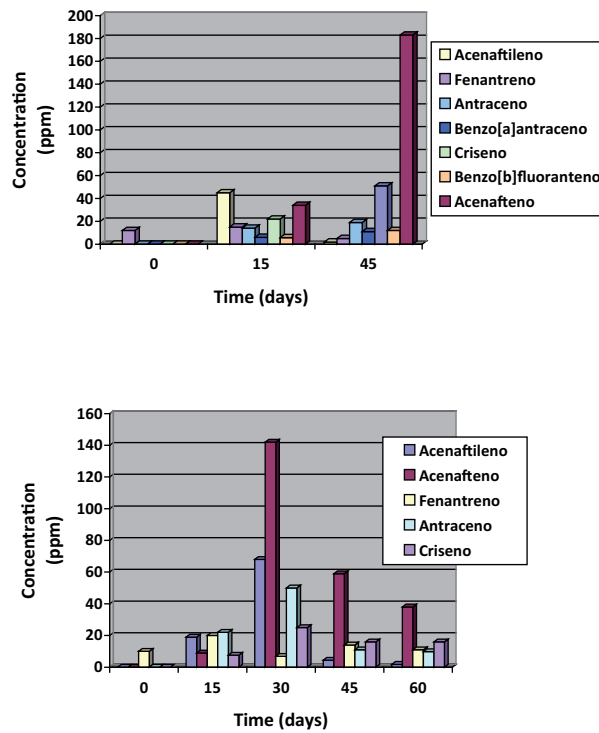
que disminuye la adecuada activación de mecanismos de defensa ante condiciones adversas [24, 25]. Estas alteraciones pueden ser más drásticas en determinados individuos ya que existen diferencias intraespecie, y no todos los organismos reaccionan de igual manera a una determinada condición, estímulo o tensor.

En cuanto a la bioacumulación, *A. similis* mostró una mayor capacidad de incorporación de HAP, lo que se evidenció tras 25 días de exposición, cuando alcanzó 7,505 ppm frente a un máximo de 4,80 ppm en *A. tuberculosa*, tras 35 días de exposición, lo que se puede interpretar como una capacidad bioacumulativa superior de la primera especie, que a la vez se puede asociar con la mayor actividad presentada, siendo su contacto con el medio mucho mayor.

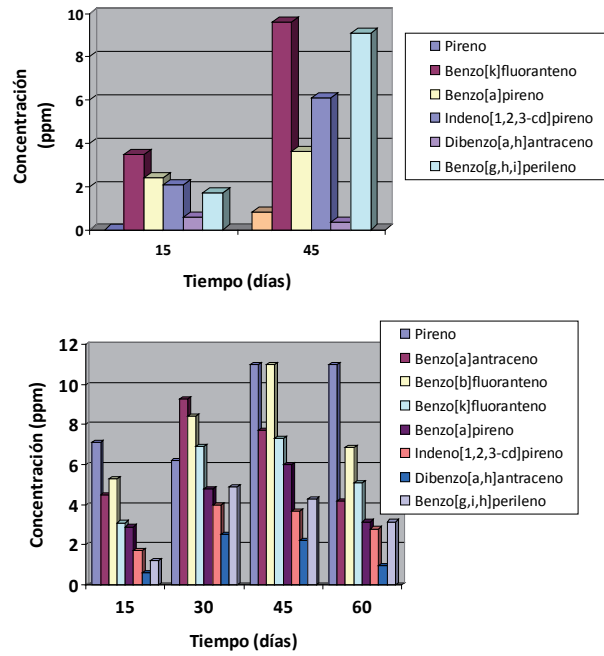
Teniendo en cuenta que una de las vías de ingreso de tóxicos al organismo es la dérmica, esta ruta de incorporación se suma a la generada por ingestión (a través del proceso de filtrado/consumo alimento), siendo un aporte adicional al que resultaría significativo al momento de comparar la acumulación presentada entre las especies.



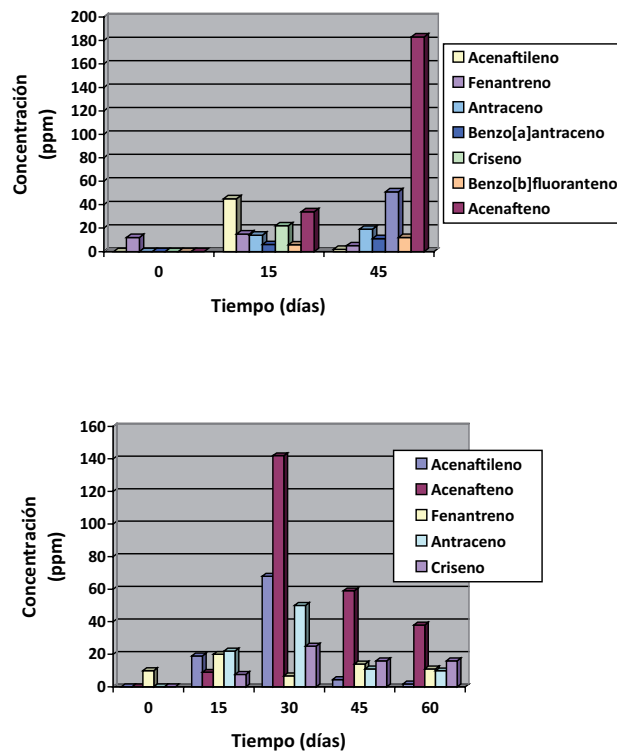
**Figure 2.** HAP's behaviour of main molecular weight in Piangua during the first test of bioaccumulation. a) *A. similis* b) *A. tuberculosis*.



**Figure 3.** HAP's behaviour of low and middle molecular weight in Piangua during the first test of bioaccumulation. a) *A. similis* b) *A. tuberculosis*.

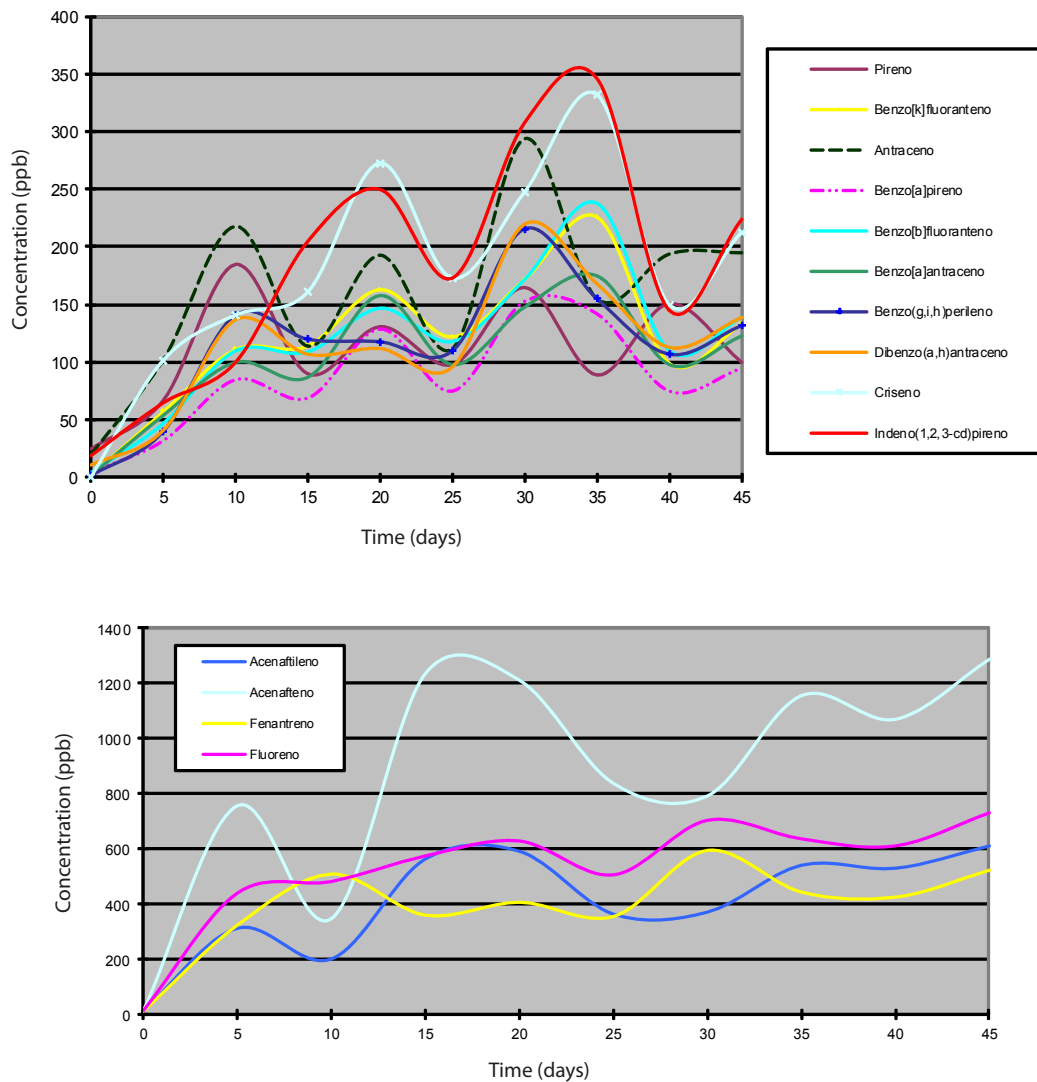


**Figura 2.** Comportamiento de HAP de mayor peso molecular en Piangua durante la primera prueba de bioacumulación. a) *A. similis* b) *A. tuberculosis*.



**Figura 3.** Comportamiento de los HAP de bajo y medio peso molecular en Piangua durante la primera prueba de bioacumulación. a) *A. similis* b) *A. tuberculosis*.





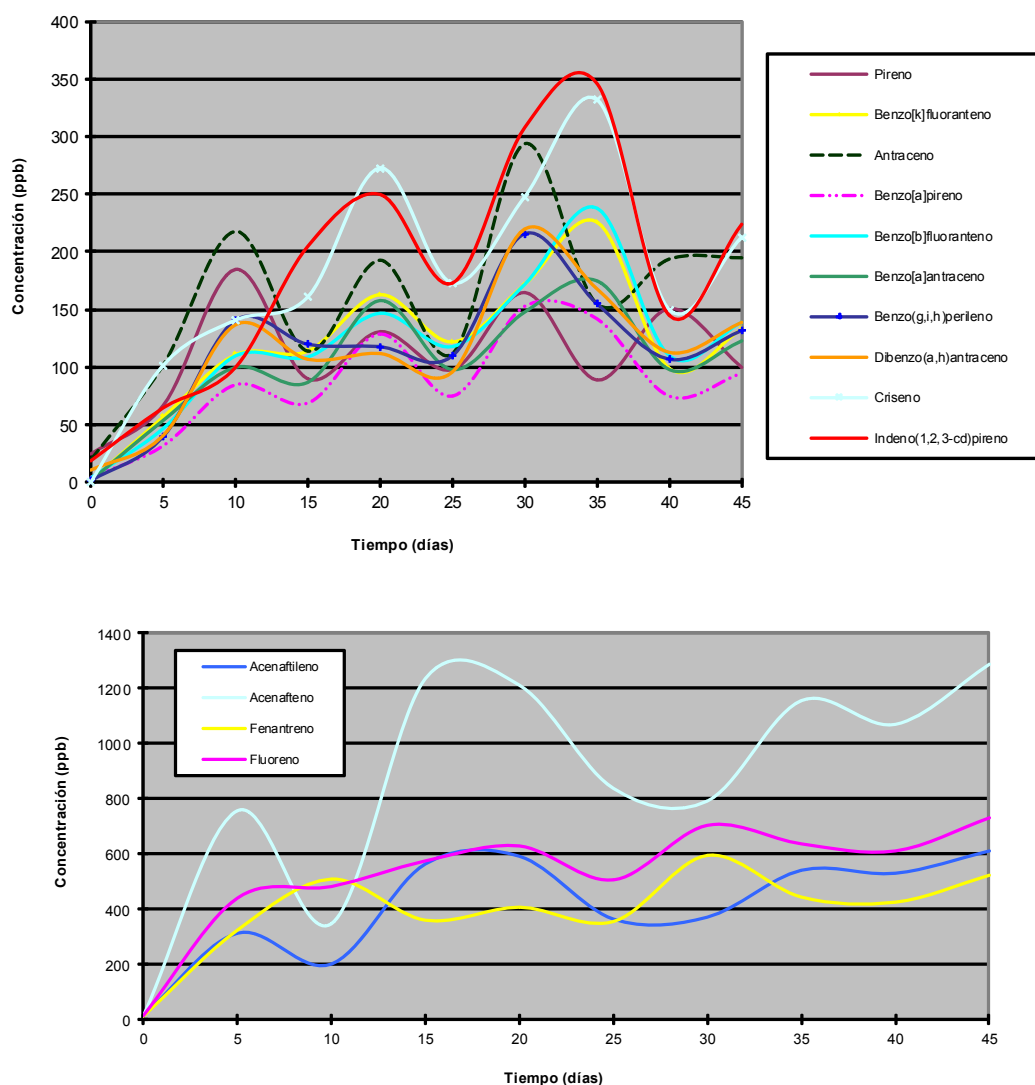
**Figure 4.** HAP's behavior in *A. tuberculosis* during the second taste of bioaccumulation to 45 days.

incorporation added to the route generated by ingestion (through the filtering process / food consumption), with an additional contribution to be significant if one were to compare accumulation between species.

Based on the fact that *A. similis* showed higher levels of PAHs incorporated with respect to *A. tuberculosis* under the same experimental conditions, it is likely that this ability is the major cause of mortality rates recorded in this species. It is likely that this difference is enhanced by the behavior of *A. similis*, in terms of increased motor activity with respect to *A. tuberculosis* and thus greater exposure of this species to the action of toxins by direct contact.

As for reference levels for organisms, the HAT set is 5 ppm [26], being overtaken by the concentration of the *A. similis* species after 15 days of exposure to a mixture of PAHs (5.66 ppm), with an additional increase on day 25 (7.505 ppm), wherein it is important to note that the reference is established for HAT, which implies that the PAH content in this concentration at levels well below this value.

Variability in the concentration of materials added by the organizations represents usual behavior when exposed to levels of pollutants in the environment, since they incorporate the compounds and perform excretion thereof afterwards, which increases and decreases respectively the concentrations in their tissues, even in



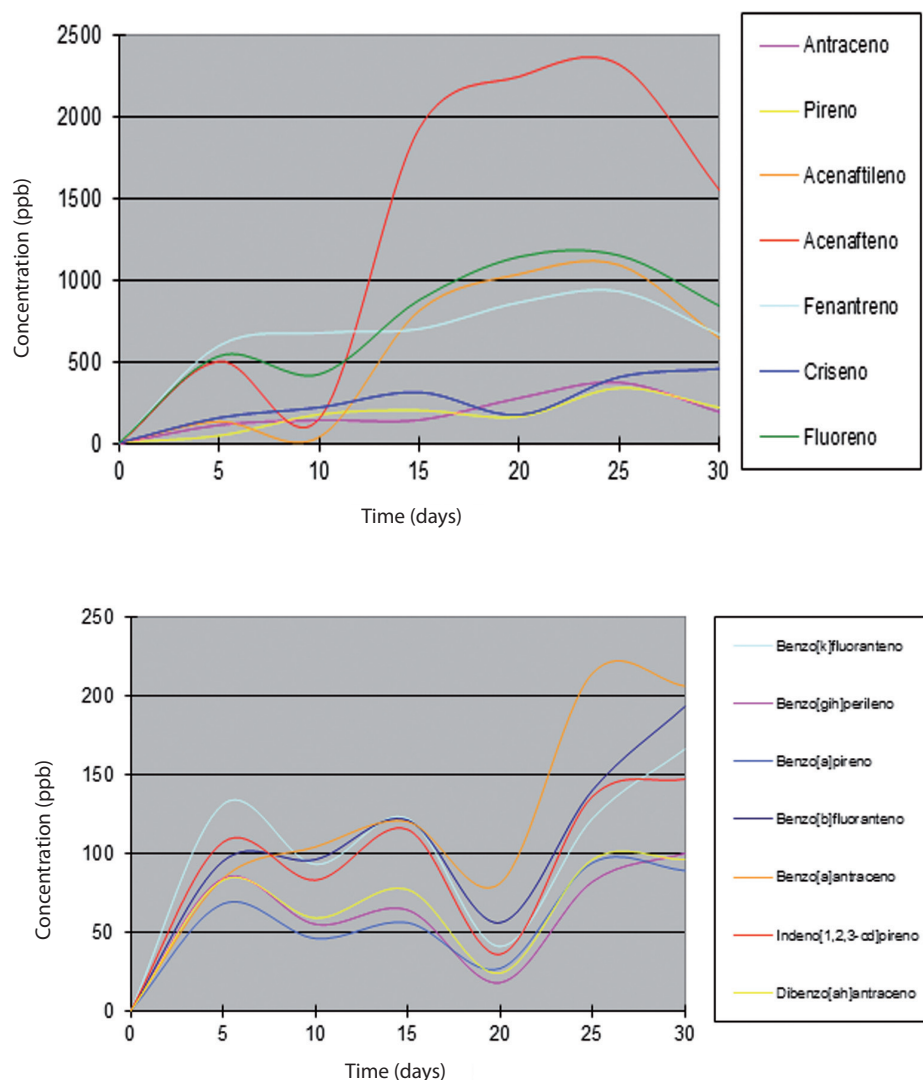
**Figura 4.** Comportamiento de HAP en *A. tuberculosa* durante la segunda prueba de bioacumulación a 45 días.

Partiendo del hecho de que *A. similis* presentó niveles superiores de HAP incorporados con respecto a *A. tuberculosa* bajo las mismas condiciones experimentales, es muy probable que esta capacidad sea la causal de los mayores porcentajes de mortalidad registrados en esta especie. Es probable que esta diferencia sea acentuada por el comportamiento de *A. similis*, en cuanto a una mayor actividad motriz con respecto a *A. tuberculosa* y por ende una mayor exposición de esta especie a la acción de los tóxicos por contacto directo.

En cuanto a niveles de referencia para organismos, el de HAT establecido es de 5 ppm [26], siendo superado por la concentración de la especie *A. similis* tras 15 días

de exposición a la mezcla de HAP (5,66 ppm), con un incremento adicional hacia el día 25 (7,505 ppm), siendo importante resaltar que la referencia se encuentra establecida para HAT, lo que implica que los HAP contenidos en dicha concentración se encuentran en niveles muy inferiores a este valor.

La variabilidad en la concentración de compuestos incorporados por los organismos representan un comportamiento usual ante la exposición a niveles de contaminantes en el medio, ya que incorporan los compuestos y realizan excreción de los mismos, lo que aumenta y disminuye respectivamente las concentraciones en sus tejidos, aún en presencia de los compuestos

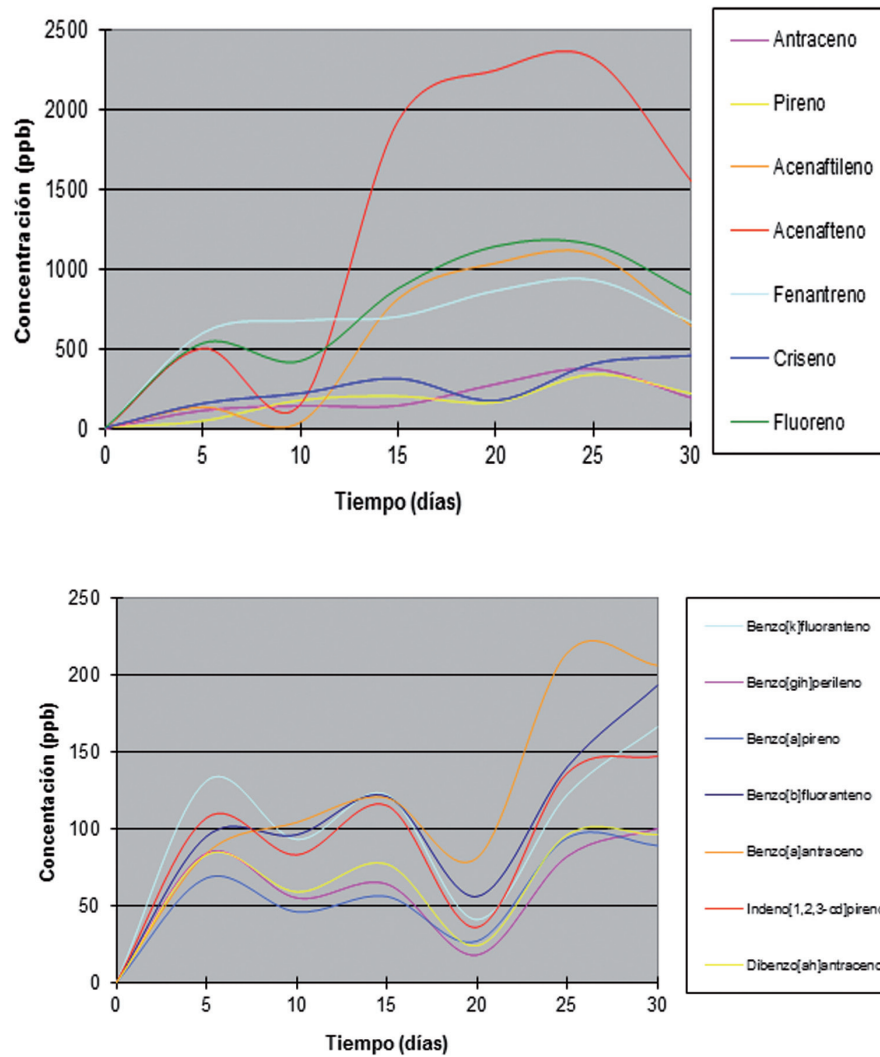


**Figure 5.** HAP's behaviour in Piangua (*A. similis*) during the bioaccumulation test of 30 days.

the presence of the compounds in the environment [27,21,22,23]. This behavior is reported in organisms in the natural environ, following assessment in areas affected by oil entrance into the marine environment; initially a rapid process of incorporation of hydrocarbons occurs, which are excreted and reduced or completely eliminated when pollution in the environ decreases or disappears [27,28].

It is important to note that in the Cove of Tumaco there are concentrations of total aromatic hydrocarbons (HAT) up to 75.9 ppm for bivalves [29], which confirms the ability of this group of organisms to bioaccumulate significant levels of pollutants present in the environment, as well as the importance of these monitoring studies of environmental quality.

As for the persistence which characterizes in particular the various compounds according to their structure, what defines the degree of bioaccumulation of each is the size of the molecule, since persistence increases with increase in size. For this reason, high - MW compounds such as benzo [a] pyrene are highly persistent and bioaccumulative. As well as persistence, toxicity and lipophilicity of the compound also increases with the increase in MW, and affected aquatic organisms are highly affected under these characteristics [30], a situation which became evident during the tests carried out with the mixture of PAHs, and in which higher concentrations of these compounds were found.



**Figura 5.** Comportamiento de HAP en Piangua (*A. similis*) durante la prueba de bioacumulación a 30 días.

en el medio [27,21,22,23], siendo un comportamiento reportado en organismos presentes en el ambiente natural, tras evaluaciones en zonas afectadas por el ingreso de petróleo al medio marino, presentando inicialmente un proceso rápido de incorporación de hidrocarburos, los cuales son excretados y disminuyen o se eliminan totalmente cuando la contaminación en el medio desciende o desaparece [27,28].

Es importante tener en cuenta que en la ensenada de Tumaco se han determinado concentraciones de hidrocarburos aromáticos totales (HAT) de hasta 75,9 ppm para bivalvos [29], lo que ratifica la capacidad de este grupo de organismos para bioacumular niveles significativos de contaminantes presentes en el medio, al igual que la importancia de los mismos en estudios de monitoreo de calidad ambiental.

En cuanto a la persistencia que caracteriza de forma particular a los distintos compuestos de acuerdo a su estructura, lo que define la mayor o menor capacidad de bioacumulación de cada uno de ellos es el tamaño de la molécula, ya que la persistencia se incrementa con el aumento en su tamaño, razón por la que los compuestos de alto PM como el benzo[a]pireno son altamente persistentes y bioacumulables. Al igual que la persistencia, la toxicidad y el carácter lipofílico del compuesto también se incrementan con el aumento de PM, siendo los organismos acuáticos altamente afectados ante estas características [30], situación que se hizo evidente durante las pruebas realizadas con la mezcla de HAP, y por ende en las que contenía concentraciones superiores de dichos compuestos.

Significant levels of low MW compounds were accumulated during these tests, not only because they were added in greater quantity, but also because it came with solvent, which made them more stable in the medium and therefore available to organisms, does not occur under natural conditions in the aquatic environment.

Despite this, low MW compounds showed large variations in incorporation, while higher MW compounds had significant incorporation levels considering that they were added in much smaller quantities. Solvent is equally important in test availability (due to low solubility of these compounds).

As regards the increase in the incorporation of compounds, low MW compounds have high short – term bioavailability as they quickly solubilize or volatilize, but likewise rapidly disappear from the medium. By contrast, although high MW compounds suffer much slower mobilization (and therefore generate no acute effects), they are much more persistent. For this reason, low MW compounds can remain at the bottom (deposits) for very long periods [31].

In none of the tests was bioaccumulation of naphthalene and fluoranthene recorded. Whereas fluorene was not incorporated during the first test, it was during the second test, albeit concentration in the medium had decreased.

The above mentioned phenomenon is related, in the case of naphthalene, to high rate of volatility and low MW. For fluoranthene, the low concentration provided (despite being superior to that provided compounds such as anthracene, pyrene, higher MW and equal to that of phenanthrene) may have resulted in failure to incorporate the compound by organisms, as it is not soluble (even with the solvent in high concentrations, thereby generating precipitation).

In the specific case of fluorene, it was added during the first test at higher levels (5 times) than for the second test. However, its lack of incorporation during the first test could be related to an important accumulation and its rapid clearance in shorter time periods than the periods assessed.

It is worth mentioning that the presence of fluorene at higher levels compared to other compounds genera-

ted broader implications, since in the PAH study group it is the one with the least toxicity after acenaphthene, in accordance with the guidelines of reference.

During the second test, the levels of PAH incorporated were in descending order: the acenaphthene and fluorene for both species, followed by phenanthrene and acenaphthylene in *A. similis* and both compounds upside to *A. tuberculosis*.

After these compounds chrysene incorporated the highest levels recorded, surpassed by indeno [1,2,3-cd] pyrene in *A. tuberculosis* and followed by anthracene in both species. The remaining compounds were incorporated in different ways by each species, being benzo [a] pyrene, the compound which showed least accumulation in them.

The compounds which have lower MW were added in higher concentrations (naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene and phenanthrene), and given their solubility, they had high incorporation levels (with the exception of naphthalene, due to its high volatility).

Despite this, acenaphthene provided in the second test ( $5.8 \times 10^{-3}$  ppm) and fluorene ( $3 \times 10^{-3}$  ppm) exceeded the concentration of acenaphthylene ( $5 \times 10^{-3}$  ppm) incorporated by the organisms of both species. The first compound more than doubled the accumulated level, although they were supplied in similar concentrations. The above – mentioned phenomenon implies higher bioavailability of this compound, associated with increased stability (as fluorene), as the MW of both compounds is higher than that of acenaphthylene.

Not only were acenaphthylene and acenaphthene provided at similar concentrations, but also their structure differs slightly, the latter being slightly superior in terms of MW.

Although anthracene has the same MW of phenanthrene, it was added in smaller proportion ( $1.2 \times 10^{-5}$  ppm) and represents a greater risk to aquatic life. This is evident upon observing that the levels of anthracene incorporated exceed those achieved by pyrene, although the latter was supplied in concentrations which are half the concentrations in the medium.



Durante estas pruebas se acumularon niveles importantes de compuestos de bajo PM; no solo porque se adicionaron en mayor cantidad, sino también porque se suministraron con solvente, lo cual los hizo más estables en el medio y por lo tanto, disponibles para los organismos, lo que no ocurre bajo condiciones naturales en el ambiente acuático.

Pese a lo anterior, los compuestos de bajo PM presentaron grandes variaciones en cuanto a incorporación, mientras que los de mayor PM presentaron niveles de incorporación significativos si se tiene en cuenta que se adicionaron en cantidades mucho menores, siendo el solvente igualmente importante en la disponibilidad de los mismos (debido a la baja solubilidad de estos compuestos).

En cuanto al incremento en la incorporación de compuestos, los de bajo PM presentan una elevada biodisponibilidad a corto plazo al volatilizarse o solubilizarse rápidamente, pero así mismo desaparecen rápidamente del medio. Por el contrario, los de elevado PM, aunque sufren una movilización mucho más lenta (y por tanto no generan efectos agudos) son mucho más persistentes, razón por la cual pueden permanecer en los fondos (sedimentos) por periodos muy prolongados [31].

En ninguna de las pruebas realizadas se presentó bioacumulación de naftaleno y fluoranteno, mientras que el fluoreno no fue incorporado durante la primera prueba, pero si durante la segunda, pese a haberse disminuido su concentración en el medio.

Lo anterior se relaciona en el caso del naftaleno con la alta tasa de volatilidad, bajo PM. Para el fluoranteno, la baja concentración suministrada (pese a ser superior a la proporcionada de compuestos como antraceno, pireno y los de mayor PM e igual a la del fenantreno) puede haber generado la no incorporación del compuesto en los organismos, ya que es poco soluble (incluso con el solvente al trabajar concentraciones altas, generando precipitado).

En el caso específico del fluoreno, durante la primera prueba fue proporcionado en niveles superiores (5 veces mayor) con respecto a la segunda prueba, sin embargo, la no incorporación durante la primera prueba podría relacionarse con una acumulación importante y una rápida depuración de la misma en periodos de tiempo menores a los evaluados.

Cabe aclarar que la presencia de fluoreno en niveles superiores respecto a los demás compuestos no gene-

ra mayores implicaciones, pues dentro del grupo de los HAP de estudio es el que presenta la menor toxicidad después del acenafteno de acuerdo con las directrices de referencia.

Durante la segunda prueba los niveles de HAP incorporados fueron en orden descendente: el acenafteno y fluoreno para ambas especies, siguiéndole el fenantreno y acenaftileno en *A. similis* y ambos compuestos de manera invertida para *A. tuberculosa*.

Después de estos compuestos el criseno registró los mayores niveles incorporados, siendo superado por el indeno[1,2,3-cd]pireno en *A. tuberculosa* y seguido del antraceno en ambas especies. Los compuestos restantes fueron incorporados de manera diversa por cada especie, siendo el benzo[a]pireno el compuesto que registró una menor acumulación en ellas.

Los compuestos que presentan menor PM se adicionaron en concentraciones mayores (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno y fenantreno), y dada su mayor solubilidad registraron altos niveles incorporados (con excepción del naftaleno, por su alta volatilidad).

Pese a lo anterior, el acenafteno proporcionado en la segunda prueba ( $5,8 \times 10^{-3}$  ppm) y el fluoreno ( $3 \times 10^{-3}$  ppm) superaron la concentración de acenaftileno ( $5 \times 10^{-3}$  ppm) incorporada por los organismos de ambas especies. El primer compuesto lo superó en más del doble del nivel acumulado, pese a que se suministraron en concentraciones similares, lo que implica una mayor biodisponibilidad de este compuesto, asociada a su mayor estabilidad (al igual que el fluoreno), ya que el PM de ambos compuestos es superior al del acenaftileno.

El acenaftileno y el acenafteno no solo fueron proporcionados en concentraciones similares, sino que adicionalmente su estructura difiere muy poco, siendo este último levemente superior en cuanto a PM.

Pese a que el antraceno tiene el mismo PM del fenantreno, fue adicionado en menor proporción ( $1,2 \times 10^{-5}$  ppm) ya que representa un riesgo mayor a la vida acuática. Lo anterior se evidencia al observar que los niveles incorporados de antraceno superan los alcanzados por el pireno, pese a que este último fue suministrado en concentraciones que lo duplicaban en el medio.

El criseno fue incorporado en niveles superiores a los presentados por el antraceno, sin embargo, su concentración duplicaba la suministrada de este último y las diferencias en cuanto a acumulación no fueron propor-

Chrysene was incorporated at levels higher than those reported for anthracene. However, its concentration doubled the supply and the differences in accumulation were not proportional, finding thus greater affinity and availability of the second compound.

As mentioned previously, the remaining compounds (highest in MW) showed a similar relationship in terms of incorporation by the species studied.

The compounds of higher MW had, during the bioaccumulation process, an oscillating behavior, but less variable than the behavior recorded for the compounds of lower MW, since the latter usually have higher solubility and bioavailability.

The trend presented by the compounds of lower MW was characterized by a significant increase in terms of integration between day 10 and 25 for *A. similis* and between days 10 and 15 for *A. tuberculosa*, precisely because of their characteristics of solubility and bioavailability. After these time periods, there were oscillations with a tendency to increase in concentration; this implies higher incorporation rate of clearance to the permanent presence of the compounds in the environment.

## CONCLUSIONS

The high rate of mortality initially recorded during the tests with the mixture of 16 PAHs and their subsequent disappearance are clear evidence of the resilience of organisms to the presence of toxic compounds in the environment.

*A. similis* has lower adaptability in captivity with respect to *A. tuberculosa*, which has an increased mortality rate.

*A. similis* proves to be more sensitive to PAH exposure; this situation is associated with higher capacity to incorporate these compounds, as well as increased toxicity when exposed to said components in relation to *A. tuberculosa*.

Compounds with higher MW have a more regular behavior in terms of incorporation and excretion with respect to lower MW, which may be related to low clearance rate and the greater persistence which characterizes them.

Low MW compounds showed a tendency to increase during the first month of study, subsequently falling in a dramatic manner given the low persistence and therefore lower retention showed by the organisms.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- [1] Eisler R. Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Eisler R. Handbook of chemical risk assessment: vol. II Boca Raton, FL. Lewis Publishers; 2000. p. 1343–1411.
- [2] Fernández, P, Vilanova RM, Martínez C, Appleby P, Grimalt JO. The historical record of atmospheric pyrolytic pollution over Europe registered in the sedimentary PAH from remote mountain lakes. Environmental Science and Technology. 2000. (34): 1906-1913.
- [3] Botello AV, Rendón-von Osten J, Gold-Bouchot G, Agraz-Hernández C (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da ed. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. México. 2005.
- [4] Potin O, Rafin C, Veignie E. Bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. International Biodeterioration and Biodegradation, 2004. 54 (1). p. 45-52.
- [5] Achten, C and T. Hofmann. Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals – A hardly recognized source of environmental contamination. Science of the Total Environment. 2009. 407 (8): 2461-2473.
- [6] Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of Polycyclic Hydrocarbons (PAHs): A review. Journal of Hazardous Materials. 2009. 169 (1 – 3). p. 1 – 15.
- [7] Rey-Salgueiro L, Martínez-Carballo E, García-Falcón M, Simal-Gándara J. Survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in canned bivalves and investigation of their potential sources. Food Research International. 2009. 42: 983–988.
- [8] ATSDR. Toxic Substances Portal [database on the internet]. Atlanta (GA): CERCLA Priority List of Hazardous Substances. 2007. [Cited 2011 Jan 26]. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>.
- [9] IARC. 1983. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Polynuclear Aromatic Compounds: Part 1, Chemical, environmental and experimental data. IARC World Health Organization. Vol. 32. Lyon: Agency for Research on Cancer; 1983. p. 95 – 431. Last updated: 17 April 1998.
- [10] Vargas VM. Mutagenic activity as a parameter to assess ambient air quality for protection of the environment and human health. Mutation Research. 2003. 544: 313-319.
- [11] Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. Mutagens in surface waters: A review. Mutation Research, 2004. 567: 109-149.
- [12] Nesto, N, Cassin D, Da Ros L. Is the polychaete, *Perinereis rullieri* (Pilato 1974), a reliable indicator of PCB and PAH

cionales, observando una mayor afinidad y disponibilidad de este segundo compuesto.

Como se mencionó previamente, los compuestos restantes (de mayor PM) no presentaron una relación similar en cuanto a incorporación por parte de las especies de estudio.

Los compuestos de mayor PM presentaron durante el proceso de bioacumulación un comportamiento oscilante, pero menos variable que el registrado por los compuestos de menor PM, ya que estos últimos suelen presentar mayor solubilidad y biodisponibilidad.

La tendencia presentada por los compuestos de menor PM se caracterizó por un incremento importante en cuanto a incorporación entre el día 10 y 25 para *A. similis* y entre el 10 y 15 para *A. tuberculosa*, precisamente por sus características de solubilidad y biodisponibilidad; transcurridos estos periodos de tiempo se presentaron oscilaciones con tendencia al incremento en concentración, lo que implica una tasa de incorporación superior a la de depuración ante la presencia permanente de los compuestos en el medio.

## CONCLUSIONES

La alta tasa de mortalidad presentada inicialmente durante las pruebas realizadas con la mezcla de los 16 HAP y su posterior desaparición, son una clara evidencia de la capacidad de adaptación de los organismos ante la presencia de compuestos tóxicos en el medio.

*A. similis* presenta una menor adaptabilidad bajo condiciones de cautiverio con respecto a *A. tuberculosa*, lo que genera mayor tasa de mortalidad.

*A. similis* resulta ser más sensible ante la exposición a HAP, situación relacionada con una mayor capacidad de incorporación de estos compuestos, al igual que una mayor toxicidad ante la exposición a los mismos frente a *A. tuberculosa*.

Los compuestos de mayor PM presentan un comportamiento más regular en cuanto a incorporación y excreción con respecto a los de menor PM, lo que puede relacionarse con la baja tasa de depuración y la mayor persistencia que les caracteriza.

Los compuestos de bajo PM presentaron tendencia al incremento durante el primer mes de prueba, descendiendo posteriormente de forma drástica, dada su baja persistencia y por tanto, la menor retención que presentan por parte de los organismos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Eisler R. Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Eisler R. Handbook of chemical risk assessment: vol. II Boca Raton, FL. Lewis Publishers; 2000. p. 1343–1411.
- [2] Fernández, P, Vilanova RM, Martínez C, Appleby P, Grimalt JO. The historical record of atmospheric pyrolytic pollution over Europe registered in the sedimentary PAH from remote mountain lakes. Environmental Science and Technology. 2000. (34): 1906-1913.
- [3] Botello AV, Rendón-von Osten J, Gold-Bouchot G, Agraz-Hernández C (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da ed. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. México. 2005.
- [4] Potin O, Rafin C, Veignie E. Bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. International Biodeterioration and Biodegradation, 2004. 54 (1). p. 45-52.
- [5] Achten, C and T. Hofmann. Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals – A hardly recognized source of environmental contamination. Science of the Total Environment. 2009. 407 (8): 2461-2473.
- [6] Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of Polycyclic Hydrocarbons (PAHs): A review. Journal of Hazardous Materials. 2009. 169 (1 – 3). p. 1 – 15.
- [7] Rey-Salgueiro L, Martínez-Carballo E, García-Falcón M, Simal-Gándara J. Survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in canned bivalves and investigation of their potential sources. Food Research International. 2009. 42: 983–988.
- [8] ATSDR. Toxic Substances Portal [database on the internet]. Atlanta (GA): CERCLA Priority List of Hazardous Substances. 2007. [Cited 2011 Jan 26]. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>.
- [9] IARC. 1983. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Polynuclear Aromatic Compounds: Part 1, Chemical, environmental and experimental data. IARC World Health Organization. Vol. 32. Lyon: Agency for Research on Cancer; 1983. p. 95 – 431. Last updated: 17 April 1998.
- [10] Vargas VM. Mutagenic activity as a parameter to assess ambient air quality for protection of the environment and human health. Mutation Research. 2003. 544: 313-319.
- [11] Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. Mutagens in surface waters: A review. Mutation Research, 2004. 567: 109-149.
- [12] Nesto, N, Cassin D, Da Ros L. Is the polychaete, *Perinereis rullieri* (Pilato 1974), a reliable indicator of PCB and PAH

- contaminants in coastal sediments?. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2010. 73: 143 - 151.
- [13] Means JC. Compound-specific gas chromatographic/mass spectrometric analysis of alkylated and parent polycyclic aromatic hydrocarbons in waters, sediments, and aquatic organisms. *Journal of AOAC International*. 1998. 81 (3): 657-672.
- [14] Pelletier E, Sargain P, Payet J, Demers S. Ecotoxicological Effects of Combined UVB and Organic Contaminants in Coastal Waters: A Review. *Photochemistry and Photobiology*. 2006. 82 (4): 981-993.
- [15] Okay OS, Karacik B. Bioconcentration and phototoxicity of selected PAHs to marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Environmental Science and Health*, 2008. 43 (11): 1234 - 1242.
- [16] Isherwood DM. Photoinduced toxicity of metals and PAHs to *Hyalella azteca*: UV-mediated toxicity and effects of their photoproducts. [dissertation] Waterloo (Ontario): University of Waterloo; 2009.
- [17] CPPS/PNUMA/COI/FAO. Curso regional CPPS/PNUMA/COI/FAO sobre bioensayos y pruebas de toxicidad en organismos marinos del Pacífico sudeste. Cartagena. 1998.
- [18] CCME. Canadian environmental quality guidelines. In: Garrett, C. Priority Substances of Interest in the Georgia Basin Profiles and background information on current toxics issues. Report of the Canadian Toxics Work Group. GBAP Publication No. EC/GB/04/79. 2004.
- [19] US EPA. Drinking water regulation and health advisories: Office of water. Washington, D.C. U.S. Environmental Protection Agency, 1996. 15 p.
- [20] APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. Washington D.C. American Public Health Association, Ap. 8010G; 1998. p. 8-20, 8-23.
- [21] Zambrano MM. Pruebas de bioacumulación y toxicidad aguda de hidrocarburos aromáticos del petróleo en moluscos bivalvos (*Anadara tuberculosa* y *Striostea prismatica*). [tesis] Cali (V): Universidad del Valle; 1996a.
- [22] Zambrano MM. Ensayos de toxicidad aguda en organismos marinos. Informe final. Tumaco (N) Centro Control Contaminación del Pacífico. 1996b.
- [23] Prada-Ríos J, Zambrano-Ortiz M. Toxicidad aguda y bioacumulación de dos hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno y fluoranteno) en *Anadara tuberculosa*. *Boletín Científico CCCP*, 2006. 13: 53 - 64.
- [24] Hannam ML, Bamber SD, Moody JA, Galloway TS, Jones MB. Immune function in the Arctic Scallop. *Chlamys islandica*, following dispersed oil exposure. *Aquat. Toxicol*. 2009. 92, 187-194.
- [25] Hannam ML, Bamber SD, Galloway TS, Moody JA, Jones MB. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. *Chemosphere*. 2010. 78, 779 - 784.
- [26] Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Narbone JF, Burgeot T, Michel X et al, editors. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. En: Gómez-López DI, Ortiz-Galvis JR. (Eds). Diagnóstico integral del impacto biofísico y socioeconómico relativo a las fuentes de contaminación en la bahía de Tumaco, Colombia y lineamientos básicos para un Plan de Manejo. Proyecto del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA - Programa de Acción Mundial PAM) y Comisión Permanente del Pacífico Sur CPPS. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR - Centro Control Contaminación del Pacífico CCCP - Corporación Autónoma Regional de Nariño CORPONARIÑO. Santa Marta. 2006.
- [27] CSIC. Impacto de un vertido de petróleo sobre los organismos marinos. Algunas lecciones del vertido del Aegean sea. Informe técnico. (Serie en línea) 2003. [Consultado 2011 abr 20]; 15. Disponible en: URL: <http://csicprestige.iim.csic.es/desarro/informcsic/15/index.htm>.
- [28] Zambrano, MM, Franco SL. Seguimiento a las Respuestas Bióticas y Abióticas de un Ecosistema de Manglar Afectado por un Derrame de Petróleo. *Boletín Científico CCCP*. 2005. (12): 37 - 48.
- [29] Betancourt JM, Sánchez JG, Troncoso W, Caviedes M, López J. Evaluación de la contaminación por hidrocarburos petrogénicos en la Bahía de Tumaco. En: Gómez-López DI, Ortiz-Galvis JR. (Eds). Diagnóstico integral del impacto biofísico y socioeconómico relativo a las fuentes de contaminación en la bahía de Tumaco, Colombia y lineamientos básicos para un Plan de Manejo. Proyecto del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA - Programa de Acción Mundial PAM) y Comisión Permanente del Pacífico Sur CPPS. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR - Centro Control Contaminación del Pacífico CCCP - Corporación Autónoma Regional de Nariño CORPONARIÑO. Santa Marta. 2006.
- [30] Antón A, Lizaso J. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Madrid. España. 2003. 255p.
- [31] Fernández, L y J. Freire. Relaciones entre la salud de los ecosistemas marinos y la seguridad alimentaria: La marea negra del Prestige como un caso de estudio. En Ferreras J, Freire J. (Eds.). Seguridad Alimentaria (I): Pesca, Acuicultura y Marisqueo. Biblioteca Monográfica de de la Fundación Instituto de Estudios Políticos y Sociales, A Coruña, 2005. p. 91 - 128.



- contaminants in coastal sediments?. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2010. 73: 143 - 151.
- [13] Means JC. Compound-specific gas chromatographic/mass spectrometric analysis of alkylated and parent polycyclic aromatic hydrocarbons in waters, sediments, and aquatic organisms. *Journal of AOAC International*. 1998. 81 (3): 657–672.
- [14] Pelletier E, Sargain P, Payet J, Demers S. Ecotoxicological Effects of Combined UVB and Organic Contaminants in Coastal Waters: A Review. *Photochemistry and Photobiology*. 2006. 82 (4): 981-993.
- [15] Okay OS, Karacik B. Bioconcentration and phototoxicity of selected PAHs to marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Environmental Science and Health*, 2008. 43 (11): 1234 – 1242.
- [16] Isherwood DM. Photoinduced toxicity of metals and PAHs to *Hyalella azteca*: UV-mediated toxicity and effects of their photoproducts. [dissertation] Waterloo (Ontario): University of Waterloo; 2009.
- [17] CPPS/PNUMA/COI/FAO. Curso regional CPPS/PNUMA/COI/FAO sobre bioensayos y pruebas de toxicidad en organismos marinos del Pacífico sudeste. Cartagena. 1998.
- [18] CCME. Canadian environmental quality guidelines. In: Garrett, C. Priority Substances of Interest in the Georgia Basin Profiles and background information on current toxics issues. Report of the Canadian Toxics Work Group. GBAP Publication No. EC/GB/04/79. 2004.
- [19] US EPA. Drinking water regulation and health advisories: Office of water. Washington, D.C. U.S. Environmental Protection Agency, 1996. 15 p.
- [20] APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. Washington D.C. American Public Health Association, Ap. 8010G; 1998. p. 8-20, 8-23.
- [21] Zambrano MM. Pruebas de bioacumulación y toxicidad aguda de hidrocarburos aromáticos del petróleo en moluscos bivalvos (*Anadara tuberculosa* y *Striostea prismática*). [tesis] Cali (V): Universidad del Valle; 1996a.
- [22] Zambrano MM. Ensayos de toxicidad aguda en organismos marinos. Informe final. Tumaco (N) Centro Control Contaminación del Pacífico. 1996b.
- [23] Prada-Ríos J, Zambrano-Ortiz M. Toxicidad aguda y bioacumulación de dos hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno y fluoranteno) en *Anadara tuberculosa*. *Boletín Científico CCCP*, 2006. 13: 53 - 64.
- [24] Hannam ML, Bamber SD, Moody JA, Galloway TS, Jones MB. Immune function in the Arctic Scallop. *Chlamys islandica*, following dispersed oil exposure. *Aquat. Toxicol*. 2009. 92, 187-194.
- [25] Hannam ML, Bamber SD, Galloway TS, Moody JA, Jones MB. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. *Chemosphere*. 2010. 78, 779 – 784.
- [26] Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Narbone JF, Burgeot T, Michel X et al, editors. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. En: Gómez-López DI, Ortiz-Galvis JR. (Eds). Diagnóstico integral del impacto biofísico y socioeconómico relativo a las fuentes de contaminación en la bahía de Tumaco, Colombia y lineamientos básicos para un Plan de Manejo. Proyecto del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA – Programa de Acción Mundial PAM) y Comisión Permanente del Pacífico Sur CPPS. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR – Centro Control Contaminación del Pacífico CCCP – Corporación Autónoma Regional de Nariño CORPONARIÑO. Santa Marta. 2006.
- [27] CSIC. Impacto de un vertido de petróleo sobre los organismos marinos. Algunas lecciones del vertido del Aegean sea. Informe técnico. (Serie en línea) 2003. [Consultado 2011 abr 20]; 15. Disponible en: URL: <http://csicprestige.iim.csic.es/desarro/informcsic/15/index.htm>.
- [28] Zambrano, MM, Franco SL. Seguimiento a las Respuestas Bióticas y Abióticas de un Ecosistema de Manglar Afectado por un Derrame de Petróleo. *Boletín Científico CCCP*. 2005. (12): 37 – 48.
- [29] Betancourt JM, Sánchez JG, Troncoso W, Caviedes M, López J. Evaluación de la contaminación por hidrocarburos petrogénicos en la Bahía de Tumaco. En: Gómez-López DI, Ortiz-Galvis JR. (Eds). Diagnóstico integral del impacto biofísico y socioeconómico relativo a las fuentes de contaminación en la bahía de Tumaco, Colombia y lineamientos básicos para un Plan de Manejo. Proyecto del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA – Programa de Acción Mundial PAM) y Comisión Permanente del Pacífico Sur CPPS. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras INVEMAR – Centro Control Contaminación del Pacífico CCCP – Corporación Autónoma Regional de Nariño CORPONARIÑO. Santa Marta. 2006.
- [30] Antón A, Lizaso J. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Madrid. España. 2003. 255p.
- [31] Fernández, L y J. Freire. Relaciones entre la salud de los ecosistemas marinos y la seguridad alimentaria: La marea negra del Prestige como un caso de estudio. En Ferreras J, Freire J. (Eds.). Seguridad Alimentaria (I): Pesca, Acuicultura y Marisqueo. Biblioteca Monográfica de de la Fundación Instituto de Estudios Políticos y Sociales, A Coruña, 2005. p. 91 – 128.