



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Evaluación toxicológica de sedimentos de la barranca Sambrano

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta

Elia Briones Corona

Directoras:

Dra. Edelmira García Nieto
Dra. Alba Mónica Montiel González

Tutores

Dra. Libertad Juárez Santacruz
Dr. Arturo Torres Dosal

Tlaxcala, Tlax.

Febrero de 2013

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ecosistemas acuáticos

Los ecosistemas acuáticos son sistemas donde los procesos están relacionados por el flujo de agua y el consiguiente transporte de energía, masa y biomasa (Cardini 2010). Se dividen en lóticos y lénticos. Los ecosistemas lóticos son aquellos donde los cuerpos de agua se mueven en una dirección más o menos definida, y el líquido se recambia por el flujo ágil, por ejemplo un arroyo o un río, y los lénticos son cuerpos de agua cuyo contenido de líquido se mueve básicamente dentro de la depresión del terreno donde se hallan, y lo hace principalmente con movimientos conectivos con un recambio de aguas más o menos limitadas, como son aguas estancadas, pantanos, estanques, lagos y los humedales, que son cuerpos de agua someros (Cervantes 2007, Sánchez 2007).

Los ecosistemas acuáticos sufren grandes variaciones a lo largo de su vida geológica y climatológica, lo que propicia heterogeneidad en su hábitat y diversidad biológica en cada sitio. En algunas regiones de México (gradiente latitudinal grande e intervalo de altitud amplio y complejo), la heterogeneidad ha sido causada por eventos tectónicos y fluctuaciones del clima, lo que ha favorecido un fraccionamiento y aislamiento de biotas antiguas y con ello una especiación geográfica (Sánchez y cols. 2003, Cervantes 2007).

Cualquier alteración a un ecosistema como aporte de sustancias antropogénicas, interrupción del flujo de agua, acumulación no natural de sedimentos, disminución del oxígeno disuelto, alteración de los ciclos hidrológicos naturales y otros factores, son capaces de modificar su equilibrio dinámico (Sánchez y cols. 2003). Este equilibrio se mantiene por la resistencia al cambio, por regeneración natural de las comunidades biológicas y por la elevada capacidad de recuperación después de las perturbaciones (resiliencia), que tratan de revertir las alteraciones. La resiliencia, depende, de la diversidad de los organismos y heterogeneidad de las funciones ecológicas, sin embargo, una vez superado el límite de perturbación que puede ser manejado por estas propiedades, los entornos acuáticos no necesariamente regresaran a su estado inicial. Si bien un excedente en los límites volumétricos permiten la dilución y degradación de contaminantes, todo ecosistema acuático empieza a deteriorarse, y no siempre con una tasa predecible, sino que debido a los efectos sinérgicos de varias alteraciones, eventualmente se precipitará su destrucción luego de un periodo de aparente resistencia (Cervantes 2007, Sánchez y cols. 2003, Sánchez 2007).

1.1.1. Generalidades de los ríos

En México, el nivel medio anual de precipitación es de 777 mm³, equivalente a 1 billón 570 mil millones de m³. De esta cantidad, 1 billón 120 mil millones se evaporan retornando a la atmósfera, 410 mil millones se escurren superficialmente para llegar a ríos y 40 mil millones se infiltran en el subsuelo para recargar los acuíferos. Considerando la superficie territorial de nuestro país, los cuerpos de agua como son ríos, presas, lagos y lagunas ocupan solo 1.42 % del territorio nacional (Cervantes 2007). Los ríos forman parte de los principales ecosistemas acuáticos transportan agua y sedimento desde las áreas de captación hasta otra corriente de agua o en el mar. Suelen circular sobre cauces rocosos (autoerosionados) y normalmente contienen aguas frías, saturadas de oxígeno. Se diferencian de los arroyos, ya que estos últimos son torrentes variables de agua, estacionales o permanentes, mansos o rápidos y con un volumen de agua menor que los ríos (Cervantes 2007, Sánchez 2007, Cardini 2010).

Distintas especies de organismos, microscópicos y macroscópicos (protozoarios, insectos, anfibios y peces, entre muchas más) han logrado adaptarse a las condiciones de los ríos, aprovechando la energía de los nutrientes orgánicos provenientes tanto de la fotosíntesis local como del medio terrestre. Las comunidades bióticas de ecosistemas acuáticos como los ríos, son muy sensibles, puede bastar un pequeño cambio para alterar su fisiología o estado de salud, del mismo modo, la vegetación forma comunidades cuya composición florística suele ser característica y puede incluir taxones endémicos. La usual transparencia del agua depende principalmente de la densidad vegetal en la cabecera, corriente arriba los cuerpos de agua lóticos fluyen por pendientes suaves, los detritos recibidos por arrastre tienden a sedimentarse en el fondo favoreciendo el desarrollo de comunidades planctónicas (Sánchez 2007).

En el curso de un río se distinguen tres niveles: el alto donde se producen los sedimentos, el medio denominado zona de transferencia donde la entrada y salida de sedimentos son similares y el bajo es el sumidero, área de deposición de los sedimentos (Cardini 2010).

1.1.2 Fuentes de contaminación y tipos de descargas

Debido a la necesidad de disponer de un abastecimiento de agua con calidad aceptable, las comunidades humanas se han asentado en los márgenes de los ríos, lo que ha propiciado el vertido de desechos domésticos. Aunado a esto, el creciente desarrollo tecnológico en las actividades agrícolas e industriales ha incrementado el uso de los ríos como fuentes de agua

y/o drenajes. Un río quizá puede degradar por un tiempo desechos domésticos producidos por pequeñas comunidades humanas asentadas en sus riberas pero no puede hacerlo con grandes cantidades de desechos locales, muchos de ellos industriales (Sánchez 2007).

Cuando el ser humano utiliza las aguas como vehículo de desechos, se denominan aguas residuales, las cuales pueden ser de dos tipos: blancas y negras. Las blancas o de lluvia proceden de drenajes o escorrentías superficiales con escasa contaminación, mientras que las aguas negras o urbanas proceden de los vertidos de la actividad humana doméstica, agrícola y/o industrial, sus caudales son menores, pero continuos y con mayor contaminación. Cuando las descargas son vertidas a un cuerpo receptor se dividen en dos categorías: puntuales y distribuidas. Las puntuales disponen de un lugar de vuelco bien definido a través de pequeños desagües o a través de grandes conductos de desagüe general, usualmente son de tipo continuo, estas descargas pueden ser municipales e industriales (sin tratamiento o con tratamiento total o parcial), las cuales incluyen materia orgánica, bacterias, nutrientes y sustancias tóxicas peligrosas. Por su parte, las descargas distribuidas son aquellas que ingresan a un río a través de escorrentía superficial, atmosférica o subterránea (Cardini 2010).

Por su origen, las descargas suelen dividirse en: a) descargas domésticas, que incluyen residuos de alimentos y de uso personal, deyecciones, productos químicos como detergentes, plaguicidas y farmacéuticos (Candela 2002, Carballo y cols. 2003); b) descargas de origen industrial, provienen de procesos de producción, transporte o almacenamiento, la composición depende del tipo de industrias que las origina, se pueden encontrar iones metálicos, hidrocarburos, detergentes, pesticidas, productos radioactivos, entre otros (Carballo y cols. 2003, Cardini 2010); c) descargas agrícolas transportan pesticidas, herbicidas, fertilizantes de origen inorgánico (sulfatos, nitratos y fosfatos) e incluyen los desechos ganaderos (Candela 2002).

Por otra parte el suelo representa un soporte de contaminantes, cuyo arrastre y eliminación depende de la intensidad de la lluvia, la escorrentía, las partículas de suelo, la protección de la superficie y la absorción por las plantas (Cardini 2010). Algunos de estos contaminantes son considerados tóxicos, debido a que son capaces de producir efectos adversos en organismos e incluso llegar a matarlos, sus efectos dependen de la concentración, estructura fisicoquímica y el tiempo de permanencia en el medio (Ize 2003, Hernández y cols.

2008, ATSDR 2010) en muchos casos han originado afecciones importantes en los acuíferos (Candela 2002).

1.2 Sedimentos: Problemática ambiental

Los ríos, lagos y costas marinas son el receptáculo de aguas residuales derivadas directamente de industrias, agricultura y asentamientos urbanos o indirectamente por deposición atmosférica de emisiones aéreas, incrementando la cantidad de contaminantes que suponen una amenaza para los ecosistemas acuáticos y la salud humana (Gil 2000). Al ingresar en ambientes acuáticos, muchos contaminantes sufren diversos procesos de sorción y desorción, procesos que se llevan a cabo en la fase sólida de dicho ambiente, esta fase se denomina “sedimentos”, los cuales, son depósitos de partículas arcillo-arenosas, materia orgánica, humus y sales minerales (Carballo y cols. 2003). Los sedimentos son reconocidos como fuente de contaminantes de los sistemas acuáticos que pueden ser introducidos en los mismos y acumularse por diferentes vías, incluyendo el vertido de efluentes. Los sedimentos de aguas dulces desempeñan un importante rol ecológico al mediar el intercambio de químicos entre las fases particulada, disuelta y biológica (Andreotti y Gagneten 2006).

La entrada constante de contaminantes a los sedimentos conlleva a su retención y acumulación durante largos periodos, donde una gran variedad de organismos se encuentran expuestos ya sea de forma directa por ingesta de sedimentos o detrito particulado e indirectamente mientras buscan alimento para subsistir, siendo ambas formas las causantes de que muchas sustancias entren a las cadena trófica y lleguen a biomagnificarse. Por esta razón los sedimentos son llamados “reservorio natural de contaminantes” siendo un componente ecológicamente importante (Carballo y cols. 2003, Lima-Cazorla y cols. 2005, Andreotti y Gagneten 2006).

1.2.1 Compuestos orgánicos persistentes

Los compuestos orgánicos, de origen antropogénico, son una de las principales causas de enfermedades crónicas en humanos, efectos toxicológicos en vegetación y fauna, y daños a la atmósfera (Uribe 2008). Se denomina compuestos orgánicos a las especies químicas que en su composición contienen carbono (C) y elementos como oxígeno (O), hidrógeno (H), fósforo (F), cloro (Cl), yodo (I) y nitrógeno (N), excepto el anhídrido carbónico, los carbonatos y los

cianuros. En este grupo están clasificados los alcoholes, cetonas, ésteres, éteres de glicol, hidrocarburos (alifáticos y aromáticos) y disolventes clorados, se caracterizan por ser combustibles, pocos densos, electroconductores y liposolubles (Hernández y cols. 2003, Arbeli 2009, Arencibia y Rosario 2010).

Los compuestos orgánicos se dividen en dos grupos, compuestos orgánicos volátiles (COVs) y El grupo de los COPs lo integran 21 compuestos de los cuales doce son plaguicidas: aldrín, dieldrín, endrín, diclorodifeniltricloroetano (DDT), clordano, heptacloro, mirex, toxafeno, clordecona, isómeros del hexaclorociclohexano (α HCH, β HCH y γ HCH); dos son sustancias producidas de manera no intencional: policlorados dibenzo-p-dioxinas (PCDD) y poli-clorados dibenzo-p-furanos (PCDF); cuatro son productos químicos industriales: bifenilos policlorados (PCBs), hexaclorobenceno (HCB), pentaclobenceno (PeCB), sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y fluoruro de perfluorooctanosulfonilo (PFOSF); y tres retardantes de flama: hexabromobifenil éter (HBB), octabromobifenil éter (c-octa BDE), compuestos orgánicos persistentes (COPs), éstos últimos, son mezclas estables muy complejas, con baja solubilidad en agua, capaces de acumularse en tejidos ricos en grasa de organismos vivos y bioacumularse a lo largo de la cadena trófica. pentabrobifenil éter (c-penta BDE) (Bejarano 2009). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) con base en pruebas científicas mediante ensayos toxicológicos, clasifica a la mayoría de los COPs como compuestos cancerígenos dentro del grupo 1 y 2 (Zuñiga 2009).

El hexaclorobenceno se usó como plaguicida para el tratamiento de semillas de trigo, cebada, avena y centeno, como preservador de madera, así como intermediario o aditivo en la producción industrial, el HCB también es un subproducto de la producción de un gran número de compuestos clorados como plaguicidas, así como de la incineración de compuestos clorados, quema de residuos peligrosos en hornos de cemento, incineración de lodos de aguas negras, de residuos municipales, residuos peligrosos y médicos y de la combustión de carbón (INE 2003, Bejarano 2004). El HCB fue prohibido en Norte América (1971), sin embargo aún se encuentra en el ambiente debido a su elevada persistencia ambiental (vida media = 23 años), se bioacumula en tejido graso de organismos vivos y entre los efectos que se han reportado es considerado un disruptor endocrino (ATSDR 2002).

Los PCBs son una familia de 209 compuestos químicos estructuralmente relacionados (congénere), cada congénere consta de dos anillos bencénicos y de uno a diez átomos de

cloro. Por su estabilidad, resistencia al paso de la corriente eléctrica, inflamabilidad y lipofilia, se han empleado como lubricantes hidráulicos, fluidos de transferencia térmica de aceites aislantes, coadyuvantes de plaguicidas y líquidos selladores. Cuando son liberados al ambiente como consecuencia de accidentes, incineraciones o vertidos incontrolados, permanecen por largos periodos, debido a su lenta degradación tienden a bioacumularse e incluso llegan a formar parte de diversas cadenas tróficas (Arrebola 2007, Miller-Pérez y cols. 2009, Espinoza-Reyes y cols. 2010). La toxicidad de los PCBs depende de la estructura química, se absorben principalmente por piel, pulmones y tracto gastrointestinal, se transportan por la sangre o hemolinfa en el caso insectos, anélidos y crustáceos, una vez en el torrente sanguíneo son redistribuidos al tejido adiposo (ATSDR 2001). El metabolismo de los PCBs se realiza por medio del complejo enzimático citocromo P₄₅₀ y comienza con la hidroxilación, proceso que origina hidroxibifenilos, siendo capaces de producir un efecto uterotrófico (Arrebola 2007).

Dentro del grupo del HCH, sobresale el lindano por ser el más utilizado, es el isómero gamma del hexaclorociclohexano, tiene actividad insecticida y constituye el 15 % del total del HCH. En la actualidad su uso está restringido e incluso prohibido en los países occidentales, sin embargo ha sido utilizado en agricultura y también en salud pública para el control de vectores. A pesar de todo en algunos lugares como España se sigue vendiendo para el control de sarna y en diversas zonas para usos agrícolas específicos. Aun cuando el uso del lindano ha sido prohibido, éste no ha desaparecido de los sitios de aplicación debido a su alta persistencia y estabilidad. Las vías de entrada a organismos son la cutánea y gastrointestinal, acumulándose en tejidos grasos como glándulas mamarias, sistema nervioso e hígado, su vía de entrada al organismo es respiratoria, cutánea y gastrointestinal (Arrebola 2007).

El DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano) es un insecticida que se utilizó para el control de plagas agrícolas y en campañas de salud contra la malaria, en México, fue utilizado hasta el año 2000. A mediados de los 70, comenzó a prohibirse su uso debido a la presencia de efectos en las aves cuyos huevos tenían cáscaras finas y frágiles, y muchas de ellas se rompían durante la incubación, lo que ocasionó una disminución de algunas especies de forma alarmante. Cuando el DDT se aplicó sobre cultivos en concentraciones bajísimas, fue cuantificado en insectos que se alimentaron de los cultivos, a concentraciones diez veces mayores. El DDT se llega acumular en cadenas tróficas por su baja solubilidad en agua y

acumulación en tejido adiposo (Yáñez y cols. 2002, Arrebola 2007, Pérez-Maldonado y cols. 2010, Martínez-Salinas y cols. 2011).

1.2.1.1 Comportamiento ambiental

Una vez que los COPs han entrado al ambiente, se distribuyen con facilidad entre los compartimientos ambientales y pueden encontrarse como gases, adsorberse a las partículas de polvos, sedimentos y suelos o a la superficie de las plantas y, en bajas concentraciones, encontrarse en las aguas de todo tipo, incluyendo las de lluvia. Su comportamiento y destino, están determinados por sus propiedades fisicoquímicas, la temperatura, humedad y otras condiciones del ambiente, características que influyen en su dispersión, lixiviado o arrastre (Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía 2003).

Los COPs poseen una alta persistencia, es decir, son resistentes a la degradación fotolítica, química y biológica, son de baja solubilidad en agua y tienen un elevado coeficiente de reparto octanol/agua ($\text{Log } K_{ow} > 5$, indicador del grado de hidrofobicidad). Características que favorecen su permanencia en el ambiente e incorporación a diversos ecosistemas. Una vez que ingresan los COPs a columnas de agua, por su capacidad lipófila, tienden a adsorberse en partículas orgánicas suspendidas, para posteriormente depositarse en los sedimentos, donde su degradación generalmente es lenta, debido a su estructura y a su alto peso molecular (Convenio de Estocolmo 2007, Montory y cols. 2008).

En aguas profundas los compuestos orgánicos permanecen en el sedimento, en cambio en aguas poco profundas, por su dinámica, se producen remociones donde los COPs sedimentados fluyen hacia la columna de agua, facilitando su transporte y biodisponibilidad (Montory y cols. 2008). La movilidad de los COPs a otros medios depende de la temperatura, en climas tropicales es mayor su volatilización, las bajas temperaturas favorecen su licuefacción (pasan de la fase vapor a la fase líquida) y se adhieren a las partículas suspendidas en la atmósfera, lo que aumenta las posibilidades de que sean depositados en la superficie terrestre por la lluvia y la nieve.

La solubilidad de COPs en agua está en función de la temperatura, pH, fuerza iónica, y presencia de otros compuestos orgánicos disueltos. La solubilidad de los ácidos orgánicos aumenta al hacerlo el pH, mientras que las bases orgánicas se comportan de forma inversa. Las sales solubles reducen la solubilidad de los COPs, la luz solar influye directa e

indirectamente en las transformaciones químicas de estos compuestos, proceso denominado fotólisis. En la fotólisis directa, la luz del sol es absorbida directamente por los COPs, mientras tanto en la fotólisis indirecta, otras sustancias como los minerales de la arcilla o las especies inorgánicas elementales absorben la luz del sol e inician una serie de reacciones que finalmente transforman los compuestos orgánicos (Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía 2003).

En los sedimentos la superficie de arcilla y los óxidos metálicos, así como la materia orgánica son los responsables de la adsorción de los compuestos orgánicos. Un porcentaje alto de materia orgánica y una textura arcillosa implican una mayor adsorción y retención de contaminantes, (Enriquez 2001). Cuando contaminantes con carga positiva ingresan al sedimento son atraídos y retenidos sobre la superficie de sedimento. La arcilla es el componente más importante del sedimento en relación con la persistencia de sustancias tóxicas, la presencia de un tóxico aumenta cuando más pequeñas son las partículas debido a que aportan una gran área superficial para su adsorción, la cual puede ser afectada por la hidrofobicidad del contaminante y la fracción de la materia orgánica en el sedimento. Las moléculas no polares o débilmente polares tienen una gran afinidad por fases orgánicas hidrofóbicas en ácidos húmicos con fuerzas de atracción débil (Van der Waals) o bien una atracción hidrofóbica y para aquellas polares sin carga demuestran una afinidad por grupos polares húmicos, sitios de coordinación de metales multivalentes en coloides, superficies minerales con grupos Si-O-Si a través de fuerzas dipolo-dipolo e ion-dipolo (Enriquez 2001, Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía 2003, Hernández y cols. 2008).

Cuando existe una adsorción entre el contaminante, la materia orgánica y/o las partículas minerales suspendidas, siguen dos caminos. Una pequeña parte es dispersada en el agua por procesos físicos de advección, lo demás se incorpora a la matriz sedimentaria, promoviendo la interacción de los COPs con las poblaciones microbianas del sedimento y con los organismos infaunales. La advección es el principal transporte y proceso de transformación de los compuestos orgánicos en sedimento, aunque también intervienen la dispersión, lixiviación, adsorción, retardo y la transformación química y biológica (Hernández y cols. 2008). Cuando el pH es neutro existe adsorción en sedimento, si el pH es alcalino o ácido disminuye la adsorción y aumenta su liberación al medio (Enriquez, 2001).

Los PCBs son compuestos muy estables por lo que no hay procesos abióticos que los degraden en suelo, son adsorbidos a la materia orgánica, entre más clorado más se adsorbe, no se modifican por la acción de ácidos ni bases fuertes. En la atmósfera, pueden ser atacados por radicales hidroxilo y por procesos de fotólisis dando lugar a compuestos de degradación, y si son irradiados con luz UV de longitud de onda adecuada pueden perder cloros, aumentando su velocidad de degradación (ATSDR, 2000).

El lindano se adsorbe fuertemente a suelos con alto contenido de materia orgánica, sin embargo existen indicaciones de que la volatilización es una ruta importante de disipación bajo condiciones tropicales y altas temperaturas. La degradación rápida del lindano ocurre por exposición a la radiación UV, formando pentaclorociclohexanos y tetraclorociclohexenos. La vida media para su degradación ambiental varía de días hasta 3 años dependiendo de factores, como el tipo de suelo y el clima. Los isómeros del HCH son resistentes a los procesos abióticos como la fotólisis y la hidrólisis salvo a pH básico (INE 2004). En el aire, el γ -HCH se convierte por fotoquímica en α -HCH y ambos pueden transformarse biológicamente en β -HCH, que es el isómero más persistente. El isómero beta es altamente recalcitrante en condiciones ambientales y es más resistente a la biodegradación que los otros isómeros de HCH. Los índices de transformación del lindano en otros isómeros de HCH dependen en gran medida del medio al que es liberado (agua, suelo, sedimentos o aire), del pH y del tipo y abundancia de microorganismos transformadores/biodegradantes (INE 2004, Wang y cols. 2010).

1.2.1.2 Efectos ecológicos

La contaminación de ecosistemas por compuestos orgánicos, el empleo de elevadas concentraciones de plaguicidas o el arrastre de estas sustancias por escorrentías superficiales, puede originar una reducción de la actividad microbiana. Los herbicidas como los ácidos aromáticos, aminas, anilinas, nitrilos, esterres y carbamatos cuando se hallan en suelos en niveles altos afectan a las cosechas posteriores, además la erosión superficial puede transportar herbicidas a los sistemas acuáticos y matar o inhibir la acción de algunas plantas acuáticas, ciertas algas y si el agua es usada para irrigación también a plantas (Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía 2003).

Cuando existe un ecosistema dañado por la presencia de COPs, se observan cambios catastróficos a simple vista como envenenamiento de abejas y otros polinizadores alimentados con flora del lugar, los pájaros o aves rapaces y mamíferos que se nutren con roedores contaminados. Al mismo tiempo se van bioacumulando en los tejidos de cada organismo expuesto, que al ir aumentando su concentración, los animales que ocupan los lugares más altos en la cadena trófica, son los que tienen mayor peligro.

1.3 Evaluación de riesgo potencial

El término riesgo describe la probabilidad de que una sustancia peligrosa produzca daño y el término peligroso se define como la capacidad de una sustancia para producir efectos adversos en los organismos (Peña y cols. 2001).

Una sustancia potencialmente peligrosa es un término general aplicable a un compuesto, una circunstancia o un campo energético que tiene repercusiones, negativas en un sistema biológico, por lo tanto, el concepto se aplica a factores de tensión tales como la radiación ionizante, mezcla de compuestos químicos o contaminación ambiental (Díaz-Barriga 1999).

La evaluación de riesgo es un proceso útil para la caracterización de la naturaleza y magnitud del riesgo por la exposición a sustancias peligrosas presentes en el medio, sus componentes más importantes son las estimaciones del peligro en función de la exposición a una o varias sustancias identificadas y la probabilidad de que esa exposición ocurra. Desde el punto de vista ecológico, el problema consiste en analizar las condiciones complejas de exposición y sus efectos en un sistema (Díaz-Barriga 1999, Mejía y cols. 2002, Xiao y cols. 2006).

Evaluación de Riesgo Ecológico es un proceso que evalúa la probabilidad de que efectos ecológicos adversos se están produciendo o puede ocurrir como resultado de la exposición a uno o más factores de estrés. Puede hacerse a una escala espacial, que van desde centímetros hasta kilómetros. Éste tipo de evaluación proporciona información sobre el proceso de transporte de contaminantes y su influencia negativa sobre las especies de los ecosistemas, además puede proporcionar un análisis efectivo sobre los contaminantes (Xiao 2006).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) propuso la metodología de evaluación de riesgo, la cual permite establecer si existe amenaza potencial que comprometa la calidad del agua, aire, suelo y/o sedimento, poniendo en peligro la salud del ser humano y biota como consecuencia de la exposición a diversos compuestos tóxicos presentes en un sitio, incluyendo aquellos compuestos que son producto de actividades industriales ajenas al sitio o cualquier otra fuente de contaminación, y define un rango o magnitud para el riesgo. Consiste en recopilar información suficiente para determinar los elementos que pueden constituir un peligro ambiental. Posteriormente a través de un análisis de la información disponible y/o visita al sitio, realizar un listado de los sitios potencialmente peligrosos con base en la identificación de posibles fuentes generadoras de sustancias tóxicas (Montalvo y Luque 2010).

La evaluación de riesgo incluye, la toxicidad de la sustancia y el grado de exposición. La evaluación de la exposición es el proceso que permite estimar la intensidad, frecuencia y duración de la exposición, o la estimulación de la exposición potencial que pudiera ocurrir por la liberación al ambiente de nuevas sustancias tóxicas. Puede hacerse por métodos directos o indirectos. Los métodos directos son en los cuales se obtienen mediciones directas de exposición debido a que existen varias rutas de exposición, si no es costoso ni factible realizar mediciones directas, se utilizan métodos indirectos de medición que combinan la información sobre las concentraciones ambientales del tóxico (Ize 2003).

1.3.1. Regulación y control de la contaminación de ríos

Actualmente no existen normas mexicanas para la regulación de contaminantes en sedimentos, por ello se recurrió a revisar normas establecidas por dependencias de otros países. El Ministerio Ambiental del Cónsul de Canadá (2002), establece límites para la protección de la vida acuática, nivel donde se presenta un efecto visible en la biota. El ISQG (Interim Sediment Quality Guidelines Canadian) para metales son: As = 5.9 mg/kg, Hg = 0.17 mg/kg, Cd = 0.6 mg/kg y Pb = 35 mg/kg. El límite máximo establecido para el DDT es de 1.19 µg/kg, para su metabolito DDE de 1.42 µg/kg y para los PCBs establece un límite de 34.1 µg/kg.

El Departamento de Protección Ambiental de New Jersey estableció un límite para la protección de la vida acuática, donde el valor para As es de 6 mg/kg 0.6 mg/kg para Cd, 31 mg/kg para Pb y 0.2 mg/kg para Hg. El límite establecido para los PCBs es de 70 µg/kg, 8 µg/kg para el DDT y de 5 µg/kg para su metabolito DDE.

1.4. Bioindicadores

La presencia de compuestos tóxicos en el ambiente implica un riesgo, no obstante, hay que detectar y cuantificar el agente químico en el organismo. La relación entre el nivel de xenobiótico y la respuesta tóxica es algo compleja, ya que depende de numerosos factores (toxicocinéticos, genéticos, etc.). Para determinar la exposición a tóxicos y su posible impacto sobre organismos es necesario aplicar metodologías de monitorización biológica mediante el uso de bioensayos, estos se caracterizan por utilizar especies de diferentes niveles tróficos de la cadena alimenticia a los que se denomina bioindicadores. Actualmente se han convertido en una forma eficaz y rápida de evaluar niveles de contaminación en matrices como agua, sedimento, suelo y aire.

Este tipo de ensayos consiste en exponer organismos de prueba directamente a la matriz ambiental para determinar los efectos tóxicos sobre éstos y la biodisponibilidad de los contaminantes presentes en el ambiente (Carballo y cols. 2003). El uso de bioindicadores permite apreciar una respuesta integral a diferentes niveles de organización (molecular, subcelular, celular, tejidos, órganos y sistemas), por la exposición a compuestos químicos o mezclas de ellos, además, son una forma eficaz que arroja resultados a corto plazo (Uribe 2008).

Los organismos generalmente usados como bioindicadores deben contar con características específicas, fáciles de obtener o cultivar, abundantes durante todo el año, sensibilidad conocida a tóxicos, además los resultados deben ser reproducibles. Las lombrices, equinodermos, colémbolos (cochinillas) y ácaros, son los organismos más utilizados para evaluar efectos agudos y crónicos de compuestos tóxicos presentes en las matrices de suelo y sedimento (Corona y cols. 2008).

1.4.1. *Eisenia foetida*

Las lombrices son el grupo dominante de invertebrados dentro del ecosistema con aproximadamente 4400 especies identificadas, de las cuales solo seis degradan residuos orgánicos. Estos organismos pertenecen al Filum Anélida, se agrupan en la categoría ecológica de epigeas, poseen una estrategia reproductiva “r” (rápida y prolífica), lo cual permite que sucesivas generaciones se vayan sustituyendo de manera continua, manteniendo

por ello altas tasas de consumo del sustrato orgánico, acelerando con ello su degradación (Marcano 2006, Saavedra 2007).

Por su abundancia y amplia distribución, posición en la cadena trófica, hábitos alimenticios, facilidad de cultivo y reproducción en laboratorio, las lombrices se convierten en modelos biológicos sensibles, útiles en estudios de evaluación de riesgo asociados a la contaminación química de suelo y sedimento (Marcano 2006).

E. foetida es conocida también como lombriz roja Californiana, su clasificación taxonómica es:

Reino: Animal

Phylum: Anélidos

Clase: Clitelados

Orden: Oligoquetos

Familia: Lumbricidae

Género: Eisenia

Especie: foetida

Nombre común: Lombriz Roja de California, Coqueta Roja.

Son gusanos alargados, segmentados y con simetría bilateral, de color marrón con bandas intersegmentarias pálidas y/o amarillentas, el número de segmentos varía de 80 a 120, cada uno es distinto, pero la mayoría de ellos contienen las mismas estructuras internas. Su longitud corporal media es de 6 a 8 cm, alcanzan un diámetro entre 3 y 6 mm, en edad adulta y un peso aproximado de 1 g, no tiene dientes. En el tercio anterior poseen una porción más gruesa de 5 mm de longitud llamada clitelo, cuya función está relacionada con la reproducción, es fotofóbica debido a células especiales situadas a lo largo de su cuerpo que le permiten detectar la presencia de luz, por lo que los rayos ultravioleta la pueden matar en pocos segundos, si las condiciones son favorables las lombrices pueden alcanzar hasta 15 años de vida (Clavería 2005, Saavedra 2007), es hermafrodita incompleta, no existe diferencia de sexo y no puede autofecundarse. Dos lombrices adultas y sexualmente maduras, en fase de acoplamiento, giran en sentido opuesto la una de la otra pudiendo contactar el aparato femenino de una con el aparato masculino de la otra. La fecundación se efectúa en el clitelo, cuyas glándulas producen

el capullo o la cápsula (cocón), con un diámetro entre 2.3 y 4.4 mm y su longitud varía entre 2.4 y 5.2 mm, si las condiciones del medio son óptimas transcurridos de 14-21 días de incubación, eclosiona la cápsula y nacen de 2 a 4 lombrices de color rosado pálido traslucido, en condiciones de moverse y nutrirse de inmediato, alcanzando su madurez sexual entre 40 y 70 días posteriores a su nacimiento (figura 1).

La cutícula es una lámina muy delgada de color marrón brillante, quitinoso, fino y transparente, que recubre a toda la lombriz como una barrera protectora del medio que la rodea. La epidermis está situada debajo de la cutícula, es un epitelio simple con células glandulares que producen una secreción mucosa, es la responsable de la formación de la cutícula y del mantenimiento de la humedad y flexibilidad de la misma.

Las capas musculares, son dos, una circular interna y otra longitudinal externa. Es un sistema muy desarrollado que le permite efectuar cualquier tipo de movimiento. Su cuerpo está dotado de una serie de anillos que son capaces de adherirse al suelo, estirarse y encogerse para realizar los desplazamientos.

El peritoneo es la capa más interna y limita exteriormente con el celoma de la lombriz, recubre los órganos principales. El celoma es una cavidad que contiene líquido celómico y se extiende a lo largo del animal, esta dividida por los septos (segmentos), que actúan como esqueleto hidrostático, en él se encuentran los órganos principales.

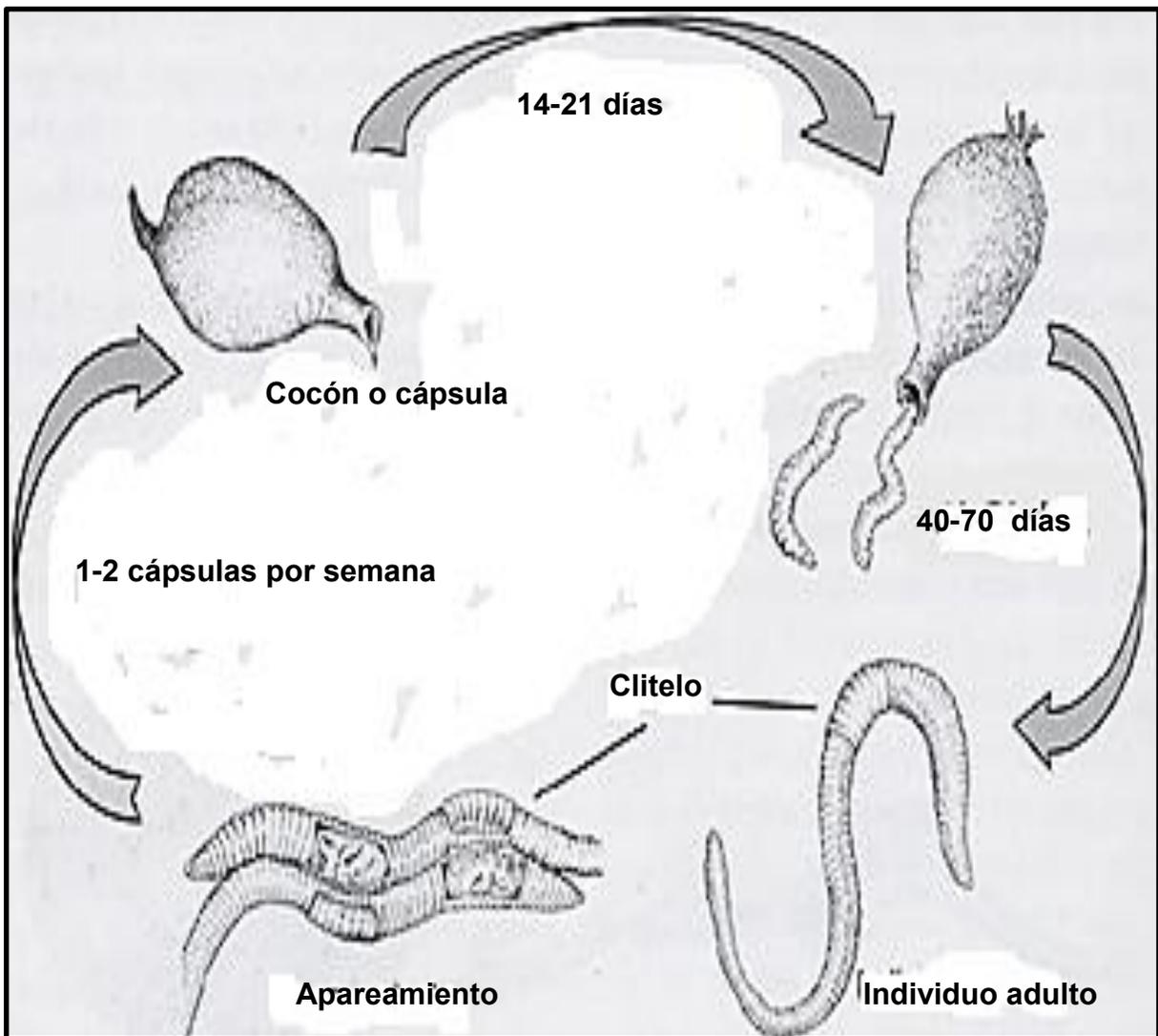


Figura 1. Ciclo de vida de *E. foetida* (Tomado de Saavedra 2007).

El aparato circulatorio, tiene una importante adaptación, está formado por dos vasos sanguíneos, uno dorsal y otro ventral, que se encargan de acarrear moléculas de alimento, gases y ciertos desechos. Posee también otros vasos capilares que llevan la sangre a todo el cuerpo la sangre circula por un sistema cerrado constituido por cinco pares de corazones encargados de bombearla.

Por su parte el aparato respiratorio es primitivo, el intercambio de oxígeno se produce a través de la pared del cuerpo por difusión. En la parte superior de la apertura bucal se sitúa el prostomio con forma de labio, las células del paladar son las encargadas de seleccionar el alimento que posteriormente pasa al esófago donde se localizan las glándulas calcíferas. Éstas

segregan iones de calcio, contribuyendo a la regulación del equilibrio ácido-básico, tendiendo a neutralizar los valores de pH. Posteriormente se encuentra el buche, en el cual el alimento queda retenido para dirigirse al intestino. El aparato excretor está formado por nefridios, dos para cada anillo. Las células internas son ciliadas y sus movimientos permiten retirar los desechos del celoma, por medio del ano, que se encuentra en la parte terminal. El sistema nervioso, posee un par de ganglios supraesofágicos, de los que parte una cadena ganglionar (figura 2).

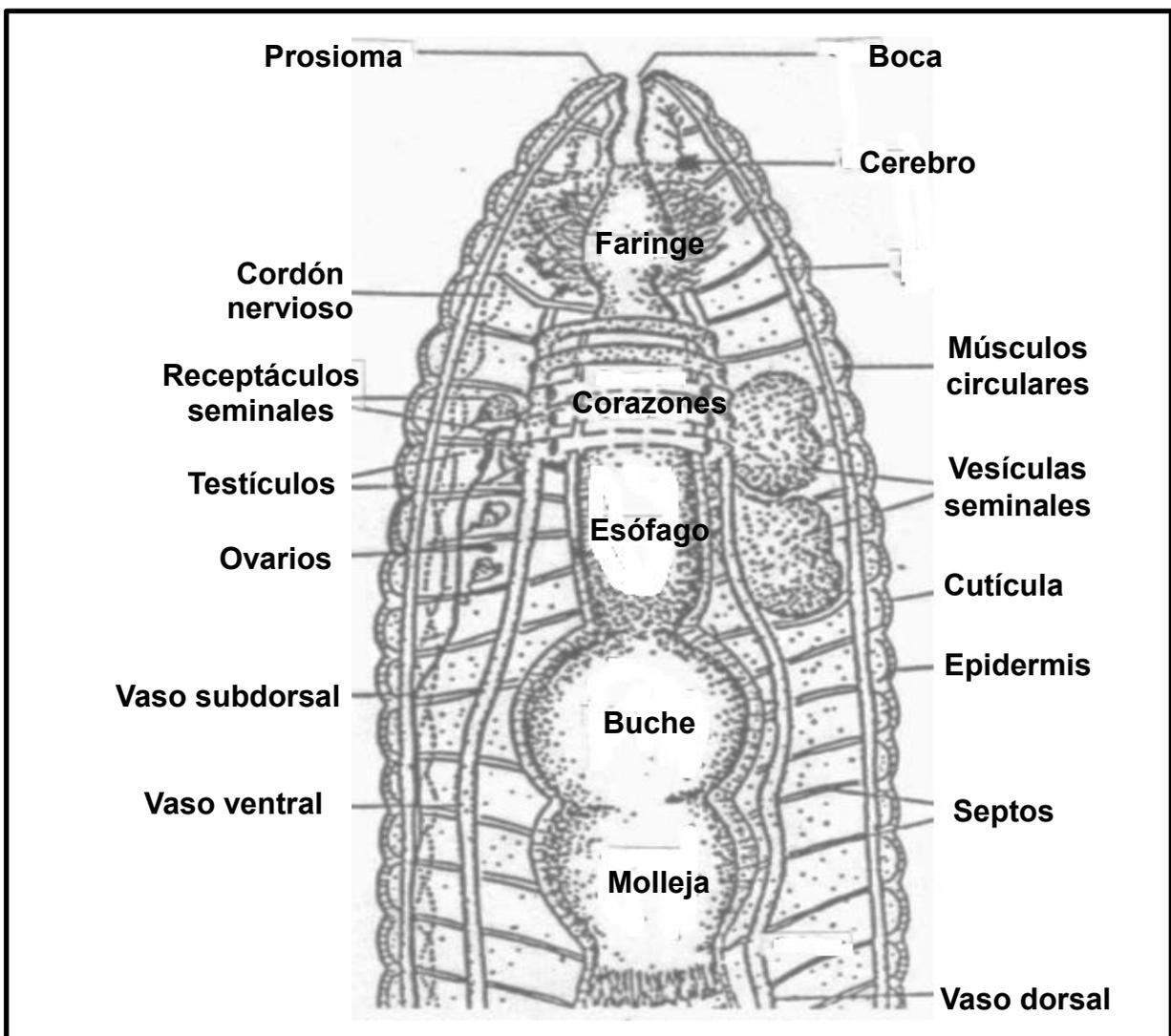


Figura 2. Estructura interna de *E. foetida* (Tomada de Clavería, 2005).

Cada lombriz está dotada con un aparato genital masculino y un aparato genital femenino. El masculino está integrado por los testículos que son las glándulas generadoras de

esperma. Su situación es anterior muy cerca de la boca, mientras que el aparato genital femenino ocupa una posición posterior relativa al masculino. Este retiene el esperma producido por el aparato genital masculino de otra lombriz hasta el momento de la fecundación.

Las lombrices reaccionan a las agresiones físicas y químicas, principalmente por la síntesis de proteínas de stress y por la modulación de la actividad de enzimas involucradas en la eliminación de xenobióticos. Se han encontrado células que comparten características similares a los linfocitos T y B, y que participan como mecanismo de defensa, estas células se llaman celomocitos, por su capacidad fagocítica éstos eliminan células transformadas, lisando de forma natural o espontánea a las células diana, cuando se ve superada su capacidad fagocítica, rodean a las sustancias extrañas para impedir su diseminación, constituyendo nódulos o encapsulándolos. En los celomocitos se puede estimar el nivel de fragmentación del DNA, pérdida cromosómica o de pequeños fragmentos de DNA (micronúcleos), transformaciones celulares u otras afectaciones provocadas por sustancias tóxicas (Arencibia y cols. 2009, Arrebola 2007, Corona y cols. 2008).

Dentro de un ecosistema son una fuente de alimento para muchos organismos como las aves y los mamíferos, por lo que es usada en muchos estudios ecotoxicológicos. Se ha empleado en bioensayos para caracterizar toxicológicamente sedimentos de ríos y suelos contaminados con aguas residuales, residuos industriales y aquellos tratados químicamente, (Anto y cols. 2008, Cussi 2010, Fuch y cols. 2010). Así mismo se utilizan para evaluar efectos de contaminantes, detectando los riesgos latentes que éstos representan, a través de la ruptura, pérdida cromosómica o de pequeños fragmentos de DNA, transformaciones celulares u otras afectaciones (Corona y cols. 2008, Ramírez y Mendoza 2008, Uribe 2008, Arencibia y cols. 2009, Cussi 2010).

1.5. Biomarcadores

Cuando un organismo está en contacto constante con un xenobiótico, éste ingresa a diversos fluidos biológicos alterando sus componentes celulares, bioquímicos, estructuras o funciones

En general se distinguen tres tipos de biomarcadores, de exposición, de susceptibilidad y de efecto. Los biomarcadores de exposición evalúan la presencia de un compuesto exógeno o un metabolito dentro del organismo mediante el análisis en fluidos corporales como sangre y

orina o incluso aire espirado. En el caso de tóxicos que se acumulan, la dosis interna puede también reflejar la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales. Por ejemplo la concentración de PCBs en sangre refleja la cifra acumulada en los principales órganos de depósito (tejido graso) (Gil 2000). Los biomarcadores de susceptibilidad sirven como indicadores de la sensibilidad individual. El efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos, generalmente se debe a factores genéticos, reconocibles por estudios de DNA y sus fragmentos de restricción (RFLOs), clonado de genes e investigación de polimorfismo de actividades enzimáticas (Gil 2000).

Los biomarcadores de efecto se usan para evaluar los cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos, incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteración en actividades enzimáticas, aparición de aductos del DNA, incrementos localizados en ARN-m, aumento de determinadas proteínas e incluso aparición de anticuerpos específicos contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares (núcleo, membrana, etc.) (Gil 2000).

Los biomarcadores de genotoxicidad ponen en evidencia las alteraciones producidas a nivel genético por agentes químicos, físicos, biológicos u otros. El concepto de genotoxicidad incluye el daño directo al DNA o cualquier alteración que conduce a un defecto en los mecanismos relacionados con la “maquinaria genética”, como variaciones en la expresión de enzimas que participan en los procesos de replicación o reparación del DNA, así como alteraciones en las fibras del huso o los centriolos, que producen fenómenos de no disyunción cromosómica. El término genotoxicidad incluye los conceptos de mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis (Poletta, 2011).

1.5.1. Ensayos de toxicidad aguda a nivel individual: letalidad

Se basa en la determinación de efectos de intoxicación aguda (mortalidad), observado durante un tiempo de exposición. El ensayo consiste en la exposición de organismos a diferentes concentraciones (al menos cinco) de un compuesto puro o combinado, o a una matriz ambiental contaminada. con él se evalúa la mortalidad de los organismos, con los datos obtenidos se construye una gráfica concentración-efecto, que es la base para la determinación de la concentración letal media (CL₅₀), (Cuevas y cols. 2008, Martínez-Jerónimo y Espinosa-Chávez 2008).

1.5.2. Ensayos de toxicidad aguda a nivel celular: citotoxicidad

La citotoxicidad se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a la muerte, existen diversos métodos para evaluarla como el ensayo de captación de rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid y la reducción del bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) (Arencibia y cols. 2003).

Los ensayos de citotoxicidad son capaces de detectar, interferencias en la estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Entre las alteraciones que pueden ser detectadas se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, cambios en el metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular, un compuesto es citotóxico independientemente de su mecanismo de acción (Arencibia y cols. 2003).

La técnica de tinción con rojo neutro determina la habilidad de los lisosomas de los celomocitos para retener el colorante durante un tiempo (Piola y cols. 2003). El rojo neutro es captado por los lisosomas y endosomas y en la medida que la célula pierde viabilidad se libera al medio el colorante, pues sólo las células viables son capaces de retenerlo. El sistema lisosomal se ha convertido en un blanco subcelular de diversos xenobióticos, ocasionando un cambio en la estabilidad de su membrana como medida general de estrés.

1.5.3. Ensayos de toxicidad aguda a nivel molecular: genotoxicidad

En general las pruebas para evaluar el daño al DNA tienen la ventaja de detectar y cuantificar el impacto genotóxico sin conocer a detalle la identidad e integridad físico-química de los contaminantes presentes. Para evaluar alteraciones al DNA en animales acuáticos se han desarrollado pruebas sobre el potencial pre-mutagénico como aductos al DNA, modificación de bases, entrecruzamientos DNA-DNA y DNA-proteínas, y rupturas a la cadena de DNA (Gil 2000).

La mayoría de las sustancias consideradas genotóxicas y/o carcinogénicas son de naturaleza altamente electrofílica, algunas otras pueden ser activadas a metabolitos electrofílicos por acción de los mecanismos metabólicos de los seres vivos. Las sustancias electrofílicas se unen covalentemente a la molécula de DNA, formando aductos o sitios AP (sitios apurínicos o apiridmínicos) y produciendo distorsión de la cadena de DNA mediante

unión a grupos amino (-NH₂), carboxilo (-COOH) o hidroxilo de las bases (Vindas y cols. 2004).

Las sustancias tóxicas pueden ser agentes alquilantes, éstos reaccionan con el DNA causándole fragmentación, transfieren grupos metilo o etilo (grupos CH₃ o CH₃-CH₂) a sitios reactivos en las bases nitrogenadas, modificándolas mediante alquilación e induciendo mal apareamiento de los nucleótidos por metilación. El sitio más vulnerable a alquilación en la guanina es el carbono 6, aquí se lleva a cabo la metilación, ocasionando un mal apareamiento con la timina, trayendo como consecuencia el cambio de bases en la replicación del DNA.

Muchos de los metabolitos reactivos originados a partir de compuestos orgánicos, causan efectos sobre el DNA, forman aductos con proteínas o DNA. Estos se pueden emplear como marcadores del daño derivado de la exposición a xenobióticos que origina un incremento en el desarrollo de procesos carcinogénicos (Gil 2000). Un ejemplo son los compuestos organofosforados que actúan como agentes alquilantes, donde, el grupo fosforilo es un sitio electrofílico potencial que puede reaccionar con el DNA y su grupo alquilo tiene la capacidad de interaccionar con centros nucleofílicos de la molécula de DNA, como es el caso del nitrógeno 7 de la guanina (Vindas y cols. 2004).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos halogenados, metales pesados, herbicidas y disolventes son capaces de originar un daño oxidativo en el organismo. En respuesta a dicho estrés oxidativo, se desencadenan mecanismos adaptativos a través de sistemas de protección como son glutatión oxidado (GSSG)/glutatión reducido (GSH) y las actividades de enzimas como glutatión reductasa, catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa (HF 2000).

Las especies reactivas de oxígeno (EROS) son agentes que alteran la estructura del DNA, sustraen un electrón, oxidan al DNA e impiden su funcionamiento. La generación intracelular de EROS aumenta por la entrada de xenobióticos naturales y antropogénicos, a través de mecanismos de óxido-reducción cíclicos activados en diversas estructuras citológicas. En la molécula de DNA atacan el grupo nucleofílico de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas, transformando las pirimidinas (Citosina y Timina) en hidantoínas, lo que conlleva a rupturas del enlace fosfodiéster (-OH y H₃PO₄) y pérdida de una base con parte del residuo del azúcar que permanece unido a ella. La mayoría de estas lesiones bloquean la DNA polimerasa (Nuseti 2006). La presencia de sustancias tóxicas con características metilantes, también causan afectaciones al DNA, mediante la adición enzimática (metiltransferasas) de un

grupo metilo-CH₃ a las bases nitrogenadas, afectando la interacción DNA-proteína (DNA polimerasas e histonas), la estructura de la molécula de DNA y su replicación.

Los entrecruzamientos, se presentan entre las cadenas de DNA o entre la cadena de DNA y proteínas, la ruptura de la cadena ocasiona la unión entre bases más cercanas o entre el grupo aldehído (-CHO) de la glucosa y el grupo amino (-NH₂) de la proteína, como resultado se interrumpe el proceso de replicación del DNA.

Los ensayos *in vivo* son de gran utilidad para determinar y evaluar daños al DNA, genes y cromosomas por la exposición a sustancias contaminantes en diversos medios. Entre las prueba para evaluar el daño que al DNA provocan algunos agentes genotóxicos, están el ensayo cometa o electroforesis alcalina de células individuales, con él se evalúan daños primarios a la estructura del DNA y el ensayo de micronúcleos el cual determina la ocurrencia de daño en cromosomas, éstos pueden considerarse como un buen biomarcador en estudios de biomonitoreo para la detección de la exposición de agentes clastogénicos (Zhong y cols. 2001).

El ensayo cometa fue aplicado en ecotoxicología hace 15 años, convirtiéndose en la prueba más popular para detectar roturas en la cadena de DNA a través de la exposición de animales acuáticos *in vitro*, *in vivo* e *in situ* (Arencibia y cols. 2009). Esta técnica permite medir eficazmente lesiones en la estructura primaria del DNA como producto de la interacción directa de los contaminantes con el mismo, porque el tiempo entre la exposición y la expresión del daño es muy corto como para desencadenar los procesos de reparación celular. El ensayo consiste en embeber células en agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) para formar un microgel, someterlas a lisis para remover todas las proteínas celulares y permitir el desenrollamiento del DNA por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrógeno entre la doble cadena bajo condiciones álcali/neutras. A pH >13 los sitios lábiles al álcali así como los sitiosapurínicos son transformados rápidamente a rupturas de cadena simple, al someter al DNA desenrollado a una electroforesis en tampón alcalino, proceso durante el cual los fragmentos cargados negativamente de DNA o cromátida relajada migra fuera del núcleo en dirección al ánodo forma un halo, apreciándose una estructura parecida a un cometa, después de teñido el DNA (Arencibia y cols. 2009).

El mecanismo por el cual se forman los cometas es un aspecto que después de muchos años todavía no se ha podido dilucidar completamente, desde las dos primeras versiones del

ensayo descritas por Ostling y Johanson en 1984 y Sing y cols. en 1998. Al respecto Klaude y cols (1996) mencionan que la cola del cometa, bajo condiciones neutras, corresponde a lazos relajados, mientras que bajo condiciones alcalinas consiste en fragmentos de DNA. Otra propuesta la hacen Singh y Stephens (1997) describiendo que durante una electroforesis neutra, las moléculas individuales de DNA están ancladas a la matriz nuclear por un extremo, mientras que el otro extremo migra fuera del núcleo por acción de un campo eléctrico, es decir, es como si cada hebra perteneciente a un cromosoma estuviese fuertemente unida a proteínas cada cierto intervalo, incluso después de la electroforesis.

Shaposhnikov y cols. (2008) utilizaron la hibridación *in situ* fluorescente mediante sondas genómicas con el fin de estudiar si la formación de la cola del cometa se explica simplemente por la relajación de lazos de DNA superenrollados. Ellos concluyeron que después de la electroforesis en condiciones neutras, donde el DNA de la cabeza así como el de la cola no está desnaturalizado, la fluorescencia de la secuencia de la sonda se dispone linealmente a lo largo de la cola desde un punto fijo de la matriz nuclear. Sin embargo, después de la electroforesis alcalina, la apariencia de la fluorescencia emitida por la sonda se muestra de manera aglomerada, lo que induce a pensar en una interpretación fragmentada de la cola, o bien, que el DNA lineal se ha conglomerado presentándose en forma de gránulos.

2. ANTECEDENTES

A continuación se presenta una breve descripción de diversos estudios relacionados con la contaminación relacionada al sitio de estudio, así como el empleo de *E. foetida* como bioindicador de contaminación ambiental y el empleo de los bioensayos de micronúcleos y cometa.

El aspecto físico y los olores característicos que se desprenden de los ríos Atoyac y Zahuapan así como de sus afluentes como la barranca Sambrano, hace evidente la contaminación que por décadas se ha manifestado en este importante recurso hídrico, sin embargo, existen pocos estudios que demuestren el tipo y magnitud de contaminantes en el agua y/o en el sedimento. En la última década algunos autores han reportado la presencia de metales pesados y compuestos orgánicos en este sistema hidrológico. García-Nieto y cols. (2011) reportaron la presencia de As y Pb en muestras puntuales en el trayecto del sistema hidrológico Zahuapan-Atoyac (SH:ZA), el intervalo de concentraciones de As osciló de 0.06 a 0.87 mg/L en agua y de 1.3 a 127 mg/kg en sedimento. Las concentraciones de HCB, Σ DDT, Σ HCH y Σ PCB en el intervalo de 138-510, 45-450, 3-27 y 59-1876 μ g/kg, respectivamente, fueron reportadas en muestras puntuales de sedimento superficial del mismo sistema hídrico (Juárez-Santacruz y cols. 2013).

La prueba de letalidad utilizando *E. foetida* ha mostrado diversas aplicaciones, Velasco en (2004), utilizó esta prueba para evaluar la eficiencia de tres tratamientos (electroquímico, surfactantes y tolueno) para remediar un suelo contaminado con hidrocarburos, el tratamiento más eficiente fue el electroquímico el cual presentó una reducción de la CL₅₀ de 88% a 63%.

La integridad de la membrana lisosomal en células celomocíticas de *E. foetida* se ha empleado como un biomarcador de daño celular para evaluar la toxicidad de sustancias puras y de suelos contaminados con mezclas complejas de contaminantes. Piola y cols. (2003), expusieron a *E. foetida* en papel filtro a concentraciones 0.25 y 4 mg/cm² de trinitolueno (TNT) durante 48 y 72 horas, la estabilidad de la membrana lisosomal se vio afectada. Un suelo contaminado con 960 g/ha del insecticida clorpirifos redujo la capacidad de retención del colorante rojo neutro, antes de la exposición el tiempo de retención fue de 60 min, posterior a la exposición, el daño fue tal que disminuyó a 20 min (Piola y cols. 2009).

E. foetida ha sido utilizada como un excelente bioindicador para evaluar el impacto de la contaminación en diversos escenarios en donde existe mezclas complejas de contaminantes, siendo la prueba de genotoxicidad uno de los biomarcadores más utilizados. Fourie y cols.

(2007) evaluaron el daño al DNA en cinco especies de lombrices (*Amyntas diffringens*, *Aporrectodea caliginosa*, *Dendrodrilus rubidus*, *Eisenia foetida* y *Microchaetus benhami*), tras la exposición a diferentes dosis de cadmio, los estudios demostraron que *Eisenia* fue la que mostró mayor sensibilidad y susceptibilidad.

Espinosa-Reyes y cols. (2010), analizaron suelo de una zona petroquímica, los niveles de COPs (HCB = 10.3 ng/g, lindano = 7.6 ng/g y PCBs = 1.2 ng/g) rebasaron los límites máximos permisibles de la guía de calidad ambiental de Canadá, además los organismos de *E. foetida* recolectados de la zona mostraron cometas con una longitud caudal (9.6µm) superior a un testigo negativo (6.6µm).

Prieto y cols. (2002), evaluaron la toxicidad de 2,4,6-trinitrotolueno (0, 0.2, 0.6, 1, y 3 mg/cm²) usando como organismo de prueba *E. foetida*, en este estudio ellos observaron una correlación entre el incremento de la dosis y los efectos de migración de DNA mediante la técnica de ensayo cometa.

Un suelo contaminado con 240 y 960 g/ha del insecticida clorpirifos mostró un índice de daño de 225 y 210 unidades arbitrarias (UA), respectivamente evaluado mediante el ensayo cometa en celomocitos de *E. foetida* (Piola y cols. 2009).

Fuch y cols. (2010) evaluaron la genotoxicidad en *E. foetida* del trinitolueno a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 µg/cm²), mediante la técnica de contacto con papel filtro, observando que a concentraciones bajas (0.25- 0.5 µg/cm²) existió daño a las 24 y 48 h, y a las 72 h el daño no se apreció, lo que pudo atribuirse a la activación del sistema de reparación del DNA, mientras que a concentración altas (1.0-2.0 µg/cm²) el índice de daño a las 72 h fue de 200 y 225 unidades arbitrarias respectivamente, sugiriendo que el sistema de reparación del DNA no fue capaz de compensar dicho daño.

3. ÁREA DE ESTUDIO

El desarrollo industrial es una de las actividades característica del estado de Tlaxcala, actualmente cuenta con tres ciudades industriales denominadas Xicohténcatl I, II y III, (ubicadas en Tetla de la Solidaridad, Huamantla y Tlaxco, respectivamente), tres parques industriales (Ixtacuixtla, Calpulalpan y Xiloxotla) y tres corredores industriales (Panzacola, Malinche y Apizaco-Xalóstoc-Huamantla), además de otras zonas con industrias como Tlaxcala, Apetatitlán, Chiahutempan, San Pablo del Monte y el Carmen Tequexquitla; la mayoría de las industrias son del giro automotriz, plástica, metal básica, petroquímica, agroquímica, papelera, metal-mecánica, textil, maquiladoras, agroindustrial, química, alfarera y cerámica.

Otra actividad en el estado de Tlaxcala es la agricultura, ésta se divide en dos modalidades, de temporal y de riego, y abarca un 59.3% de superficie. En los últimos años se ha visto un incremento en la agricultura de riego, llegando a alcanzar un 11% del total, el agua usada para regar las parcelas en muchos de los casos proviene de efluentes cercanos.

La agricultura de riego se concentra en tres regiones principales, la primera y más importante localizada al suroeste del estado que abarca Ixtacuixtla, Santa Ana Nopalucan, Nativitas, Santa Apolonia Teacalco, Tetlatlauca, San Damián Texoloc, Panotla y Tlaxcala, la segunda hacia la porción norte y noreste del estado, en los municipios de Benito Juárez, Tlaxco, Hueyotlipan, Muñoz de Domingo Arenas, Lázaro Cárdenas y Atlangatepec y la última hacia el oriente de la entidad, en los municipios de Huamantla, Ixtenco, Zitlaltepec de Trinidad Sánchez Santos y Cuapiaxtla (INFDMGET 2008).

La barranca Sambrano está ubicada en el corredor industrial Malinche y se origina de los deshielos del volcán la Malinche, atraviesa los municipios de San José Teacalco, Tzompatepec, Xalostoc y Apizaco hasta unirse al río Texcalac, el cual sigue su camino hasta converger con el río Apizaquito, éste a su vez confluye con el río Atenco y finalmente desemboca al río Zahuapan. Tiene una longitud de aproximadamente 10 km, se ubica entre las coordenadas geográficas 19°23' y 19°25' latitud norte y 98°3' y 98°5' longitud oeste. En su recorrido la barranca Sambrano recibe descargas municipales y agrícolas, además de efluentes industriales provenientes de la zona industrial de Xalostoc (García-Nieto y cols. 2011).

La zona industrial Xalostoc constituye una importante base para el desarrollo industrial del estado, debido a su estratégica localización dentro de la franja del corredor industrial Apizaco-Xalostoc-Huamantla, está ubicada en el municipio de San Cosme Xalostoc a 2500

msnm, se sitúa en un eje de coordenadas geográficas entre los 19° 24' 13" latitud norte y 98° 02' 55" longitud oeste. Desde el año 2009, este sector industrial está integrado por 10 empresas de diversos giros, de las cuales 2 son metal básica, 2 químicas, 1 plástica, 2 petroquímicas, 1 agroindustria, 1 partes automotrices y 1 confección (INFDM 2008).

De la industria petroquímica y de plásticos perteneciente a la zona industrial Xalostoc, derivan actividades como la síntesis de compuestos orgánicos (anhídros y plásticos), poliestirenos sin elección, poliestirenos india y anhídrido ftálico, en estas actividades se liberan grandes cantidades de contaminantes, como formaldehído, cadmio en forma de óxido, cloruro o sulfato, ftalatos o polibromados. Durante sus procesos emplean como materia prima el etileno, que permite la obtención de diferentes monómeros como acetato de vinilo, alcohol vinílico, cloruro de vinilo, entre otros (EPA 2003, Méndez 2002).

Las industrias de la rama química, se encargan de la fabricación de productos químicos como herbicidas, tensoactivos, secuestrantes y fungicidas, en los que se ha reportado que durante el proceso liberan compuestos como clorobencenos y cadmio (Brigden y cols. 2010).

En las ramas metal básico y automotriz se fabrican varilla, aceros especiales, engranes de ejes y crucetas, utilizan como materia prima polvo de cobre, bronce, aluminio, pastas de bronce y pigmentos metálicos, Brigden y cols. (2010) reportan que en esta rama se llegan a producir contaminantes como el cromo, cobre, plomo, zinc La agroindustria se dedica a la fabricación y venta de alimentos balanceados agropecuarios (Méndez 2002).

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

4.1. Pregunta de investigación

¿Cuál es el nivel de toxicidad que presentan los sedimentos en cada punto de muestreo de la Barranca Sambrano?

4.2. Hipótesis

Los sedimentos de la barranca Sambrano producirán toxicidad sobre *Eisenia foetida*, la magnitud del efecto dependerá de los compuestos generados por las actividades antropogénicas de la zona industrial Xalostoc.

4.3. Justificación

El vertido de descargas a la barranca Sambrano provenientes principalmente de la zona industrial Xalostoc, por su posible composición, constituye una fuente potencial de contaminación y toxicidad a la biota nativa, por lo que es necesario evaluar el grado de toxicidad en esta zona mediante un bioindicador.

El presente trabajo contribuirá en la generación de conocimiento básico para la evaluación de riesgo ecotoxicológico o en salud humana en la barranca Sambrano.

5.1. Objetivo general

Evaluar el daño toxicológico ocasionado por el sedimento en cada punto de muestreo de la barranca Sambrano, empleando *Eisenia foetida* como bioindicador.

5.2. Objetivos específicos

- Seleccionar los sitios de muestreo mediante el reconocimiento del sitio y la ubicación de posibles fuentes de contaminación.
- Evaluar el nivel de toxicidad de los sedimentos en *Eisenia foetida* a tres niveles de organización:
 - Individual mediante conteo directo de la letalidad.
 - Celular mediante la prueba de citotoxicidad con rojo neutro.
 - Molecular a través del daño al DNA con el ensayo cometa.

6.1. Inspección y selección de sitios de muestreo

La inspección a la barranca Sambrano se realizó aplicando la metodología de evaluación integral de riesgo (Mejía y cols. 2004, Torres-Dosal y cols. 2006). La selección de los sitios de muestreo se realizó con base a las descargas industriales, urbanas y agrícolas, la accesibilidad al lugar, además de considerar aquéllos sitios de mayor riesgo de exposición para la población humana.

Durante la inspección se establecieron 10 sitios de muestreo, separados entre sí por una longitud aproximada de 1 km, los cuales se geo-referenciaron con un GPS. El primer punto corresponde al inicio de la barranca identificado con la clave 290 y fue considerado como sitio de referencia debido a que la zona aparentemente no estaba impactada por actividades antropogénicas, el resto se ubicaron río abajo hasta aproximadamente 100 m antes de su confluencia con el río Texcalac.

6.2. Recolección de muestras de sedimento superficial

El muestreo se realizó en época de estiaje (febrero 2011). Las muestras de sedimento superficial (0-15 cm) se recolectaron a la orilla del cauce con ayuda de una draga de metal en recipientes de vidrio (1 L) de boca ancha, se mantuvieron y transportaron a 4 °C hasta el laboratorio de Toxicología Ambiental, donde se realizó su análisis.

El sedimento se sometió a sequedad a 75 °C, de 3 a 7 días dependiendo de la humedad de la muestra, se trituraron con ayuda de un mortero y se tamizaron una parte con un tamiz de luz de malla de 2 mm para la determinación de textura, y la otra parte con malla de 600 micras, para el resto de los análisis. Las muestras se conservaron a 4 °C envueltas en papel aluminio y dentro de bolsa de polietileno debidamente etiquetadas.

6.3. Caracterización fisicoquímica de los sedimentos

La ley para la prevención y gestión integral de los residuos (LGPGIR 2010), establece la determinación de pH, materia orgánica (MO), conductividad eléctrica (CE), textura y capacidad de intercambio catiónico (CIC), para complementar la descripción del comportamiento ambiental de los contaminantes (figura 3).

6.3.1. Potencial de hidrógeno

En un matraz de 50 ml se colocaron 5 g de sedimento y se adicionaron 10 ml de KCl 1 N (relación 1:2), se agitó en intervalos de 5 min, durante 30 min, transcurrido el tiempo se mantuvo en reposo durante 15 min y se midió el pH con un potenciómetro marca Denver Instrument Modelo 215 (NOM-021-SEMARNAT-2000, Goyberg-Reín y Vázquez 2003).

6.3.2. Materia orgánica

La determinación de la materia orgánica se realizó por el método de Walkley y Black (NOM-021-SEMARNAT-2000). Este método se basa en la oxidación de carbono orgánico a través de una disolución de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y del calor de reacción que se genera al mezclarla con ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado.

Se colocaron 0.5 g de sedimento en un matraz de 500 ml, se adicionó 10 ml de $K_2Cr_2O_7$ 1 N y 20 ml de H_2SO_4 concentrado, se agitó suavemente para asegurar la mezcla del sedimento con los reactivos, se dejó en reposo durante 30 min, en seguida se añadieron 200 ml de agua destilada y 5 ml de ácido fosfórico (H_3PO_4) concentrado, finalmente se adicionaron 5 gotas del indicador difenilamina. La titulación se llevó a cabo con sulfato ferroso ($FeSO_4$) 1M, hasta un punto final verde claro, donde el exceso de $K_2Cr_2O_7$ sin reducir es determinado por $FeSO_4$ (Goyberg-Reín y Vázquez 2003), al mismo tiempo se realizó un blanco de reactivos. La cantidad de materia orgánica se determinó mediante las siguientes ecuaciones.

$$\% MO = \% CO (FV) \qquad \% CO = \left(\frac{B - T}{W} \right) (N)(FC)$$

Donde:

MO = materia orgánica

CO = carbono orgánico

FV = factor de Van Bemmelen, el cual considera que la materia orgánica contiene en promedio el 58% de Carbono (1.724).

B = volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el blanco de reactivos (ml)

T = volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra (ml)

N = normalidad exacta del sulfato ferroso (se valoró al momento de analizar las muestras)

W= peso de la muestra empleada (g)

FC = factor de corrección, debido a que el método sólo oxida el 77 % del Carbono (0.39).

6.3.3. Conductividad eléctrica

Se realizó en la fase soluble del sedimento, los materiales contaminantes contenidos en él se llevaron a esta fase mediante un extracto de saturación, la medición electrolítica, se realizó como lo establece la NOM-021-SEMARNAT-2000.

En un vaso de precipitados de 250 ml se colocaron 100 g de sedimento y se le agregó 28 ml de agua, con la ayuda de una espátula se homogenizó la muestra, se dejó reposar durante 24 h, posteriormente se adicionaron 50 ml de agua y se prosiguió a filtrar con papel filtro Whatman No. 40, de 125 mm de diámetro. El filtrado se aforó a 50 ml con agua destilada, se adicionaron 3 gotas de hexametáfosfato al 0.1 % para permitir que las partículas de sedimento precipiten la conductividad eléctrica se midió con un conductímetro marca Hach, sension 156.

6.3.4. Textura

La textura se determinó según el método del hidrómetro de Bouyoucus establecido en la NOM-021-SEMARNAT-2000. Se colocaron 50 g de sedimento en un vaso metálico de 250 ml, se agregó agua desionizada hasta 5 cm por debajo del borde, enseguida se añadió 35 ml de defloculante [hexametáfosfato y carbonato de sodio (NaPO_3)₆ y Na_2CO_3]. El vaso se colocó en una batidora marca Osterizer y se agitó durante 6 min para dispersar las partículas; Se vació el contenido a una probeta de vidrio de 1 L, se introdujo el hidrómetro de bouyoucus y se aforó a 1 L, se retiró el hidrómetro y se agregó 130 ml de agua desionizada. Se agitó vigorosamente por inversión durante 1 min., se coloca en posición vertical, después de 15 s se introduce lentamente el hidrómetro y a los 40 s se toma la lectura y los datos de temperatura. A las dos horas se realiza una segunda lectura. Por cada grado arriba o debajo de 19.5 °C se aplicó una corrección de 0.36 graduaciones sobre el hidrómetro (restando 0.36 por cada °C abajo o sumando 0.36 por cada °C arriba de 19.5 °C). El contenido de arena, limo y arcilla se determinó con las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de Arena total} = \frac{\text{lectura a los 40s} \times 100}{\text{g de suelos seco}} \quad \% \text{ de Arcilla total} = \frac{\text{lectura a las 2h} \times 100}{\text{g de suelos seco}}$$

$$\% \text{ de Limos} = \frac{\text{lectura a los 40s} - \text{lectura a las 2h} \times 100}{\text{g de suelos seco}}$$

La clase textural del sedimento se identificó con el triángulo de texturas de la USDA (United States Department of Agriculture) sobreponiendo los datos.

6.3.5. Capacidad de Intercambio Catiónico

La capacidad de intercambio catiónico es el proceso reversible por el cual las partículas sólidas del sedimento adsorben iones de la fase acuosa liberando al mismo tiempo otros iones en cantidades equivalentes, estableciéndose un equilibrio entre ambas fases. A pH bajos los hidrógenos (H^+) están fuertemente adheridos, pero a pH altos los H^+ de los grupos carboxílicos primero y fenólicos después, se disocian y pueden ser intercambiados por cationes. En consecuencia, la capacidad de cambio de cationes aumenta con el pH. La capacidad de intercambio catiónico varía entre 3 meq/100g para arcillas del tipo de la kaolinita hasta 120 y 200 meq/100g para montmorillonita y vermiculita, respectivamente. La materia orgánica contribuye con 200 a 400 meq/100g. En términos generales se puede considerar que existen 0.5 meq de capacidad de intercambio por cada unidad de porcentaje de arcilla y 2.0 meq por cada por ciento de materia orgánica del suelo.

En un tubo de centrifuga de 50 ml se depositaron 2 g de sedimento y 25 ml de solución de cambio (cloruro de bario 0.5 N y trietanolamina 0.2 N) se mantuvieron en agitación constante por 60 s, se centrifugó a 3500 rpm durante 8 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 25 ml de sulfato de magnesio 0.1 N, se agitó nuevamente durante 60 s y se volvió a centrifugar a 3000 rpm por 5 min. De la suspensión resultante se vertieron 10 ml en un matraz Erlenmeyer, 10 ml de agua, 10 de solución tampón con dilución 1:5 de cloruro de amonio 1 N e hidróxido de amonio 1N y 6 gotas de indicador negro de eriocromo T. Por último se valoró con una solución complejante de EDTA 0.05 N, hasta viraje azul. Se realizó un blanco de reactivos, con adición de 10 ml de sulfato de magnesio (Abadía y cols. 1980).

Para realizar los cálculos se empleó la siguiente ecuación:

$$CC = \frac{(M - N)0.05 \times 2.5 \times 100}{p} = \frac{(M - N)12.5}{p}$$

Donde:

M =volumen en ml de la solución complejante empleada en valorar 10 ml de MgSO₄.

N = volumen en ml de la solución complejante emplead en valorar 10 ml del extracto

p = peso en gramos de la muestra

2.5 = factor de dilución



Figura 3. Caracterización fisicoquímica de sedimentos superficiales de la barranca Sambrano.

6.4 Ensayos de toxicidad aguda con *Eisenia foetida*

Para la exposición se eligieron organismos (n = 10) siguiendo un diseño completamente al azar, con 3 réplicas por muestra. Se trabajó a ciego simple asignando un código a las muestras por un segundo investigador (290, 280, 270, 260, 250, 240, 230, 220, 210, 200). En recipientes de vidrio de 500 ml, se depositaron 200 g de sedimento y 10 organismos adultos de *E. foetida*, cuidando que tuvieran el clitelo bien formado y con un peso entre 300 y 600 mg, la exposición se realizó durante 15 días a una temperatura de 22 a 28 °C y humedad de 30 a 40 %.

6.4.1 Determinación de porcentaje de letalidad mediante conteo directo

Para determinar el porcentaje de mortalidad se vertió el sedimento en una charola de metal y se realizó un barrido minucioso de cada sedimento, contando el total de organismos vivos. Los datos obtenidos se expresaron en porcentaje de mortalidad.

Los sedimentos que produjeron letalidad en el total de organismos se diluyeron al 60 y 40 % para obtener organismos de *E. foetida* para las pruebas de cito y genotoxicidad. Se eligieron dos sedimentos para realizar una curva concentración-efecto citotóxico (figura 4).



Figura 4. Ensayo de letalidad con Eisenia foetida.

6.4.2 Extracción de celomocitos

Una vez concluida la exposición, se tomó al azar 3 lombrices de cada réplica (9 por muestra), se colocaron en cajas Petri con papel filtro húmedo durante 24 h para purgarse, posteriormente se transfirieron a tubos de ensayo que contenían 3 ml de solución de extrusión (etanol al 5 %, NaCl al 95 % y EDTA 2.5 mg/ml), se dejaron en incubación durante 2 min a temperatura ambiente, pasado el tiempo se retiraron las lombrices y a la suspensión celómica se le agregó 6 ml de buffer fosfato-salino (PBS) 1X previamente enfriado a 4 °C, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min, el precipitado se resuspendió en 200 µl de PBS 1X a 4 °C (Modificado de Di Marzio 2005). A partir de esta suspensión se realizaron el ensayo de cito y genotoxicidad.

6.4.3 Análisis de la citotoxicidad en celomocitos utilizando la prueba de rojo neutro

La prueba de citotoxicidad se basa en la detección del daño producido por diversos compuestos tóxicos sobre la integridad de la membrana lisosomal de células y sobre el control del flujo de colorante a través de la misma; donde la acumulación del colorante ocurre por unión a cargas ácidas fijas, como polisacáridos ácidos dentro de la matriz lisosomal después de la incubación con agentes tóxicos. Los efectos son apreciables cuando existe una disminución en la capacidad de las células para asimilar y retener el colorante rojo neutro en el interior de los lisosomas (Uribe 2008).

En tubos de ensayo se colocaron 100 μ l de la suspensión de celomocitos, se agregó 2 ml de colorante rojo neutro (50 μ g/ml) y se incubó a 22 °C por 3 h. El colorante se eliminó por centrifugación a 3,500 rpm durante 5 min, el precipitado se resuspendió con 2.6 ml de solución de ácido acético al 1 % y etanol al 50 %, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min y se realizó la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro modelo Jenway 6715 UV/ Vis a 540 nm, tomando como referencia el testigo negativo (figura 5).

6.4.4. Evaluación del daño al DNA a través del ensayo cometa

Este ensayo se realizó a los organismos de las muestras 290, 280 y 230, las cuales se eligieron con base en la posición que ocupan en el trayecto de la barranca Sambrano, la 290 se considera sitio de referencia y las otras dos se localizan después de dos posibles fuentes de contaminación.

En un tubo eppendorf se mezcló 100 μ l de suspensión de celomocitos con un volumen igual de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF), 75 μ l de la mezcla se colocaron en un portaobjetos previamente tratado con agarosa regular (AR), se dejó solidificar a 4 °C durante 5 min, se aplicó una segunda capa de ABPF. Una vez solidificado se sumergió en un vaso coplin que contenía 45 ml de solución de lisis (NaCl, EDTA, Tris-base, DMSO y Tritón X-100, pH 10) por 24 h a 4 °C.



Figura 5. Ensayo de citotoxicidad en celomocitos de *Eisenia foetida* por el método espectrofotométrico utilizando rojo neutro como indicador.

Las laminillas se colocaron de forma horizontal en una cámara de electroforesis (marca Thermo EC Midicell EC330) que contenía amortiguador alcalino (4 °C) recién elaborado (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM, pH>13) durante 10 min a 4 °C para el desenrollamiento de las hebras del DNA, posteriormente se aplicó una corriente electroforética (12 V-230 mA) con una fuente de poder (marca Bio-Rad Modelo Power Pac Basic) durante 10 min. Las laminillas se neutralizaron realizando dos lavados con una solución de Tris-HCl pH 7.5 y agua desionizada, se dejaron secar y fueron almacenadas hasta su lectura.

Para el análisis de las laminillas se utilizó un microscopio de fluorescencia (LEICA DM 2000), equipado con lámpara de mercurio a un aumento de 40X. Las laminillas se tiñeron justo antes de la lectura con 20 µg/ml bromuro de etidio. Se contaron 100 moléculas de DNA por organismo (n = 9) clasificándolas en 4 categorías de daño (0 a 3) de acuerdo a la longitud de la cauda (figura 6). Donde la clase 0, son aquellas moléculas de DNA que no presentan cauda (normales); la clase 1, incluyó aquellas cuya longitud de la cauda fuese menor al diámetro de la cabeza; la clase 2, fueron moléculas con una longitud caudal entre 1 y 2 veces el diámetro de la cabeza; y la clase 3, moléculas con una longitud caudal mayor a dos veces el diámetro de la cabeza (Zuñiga 2009). Las moléculas que no presentaron una cabeza definida

debido a que todo el DNA estaba totalmente fragmentado y que presentaban forma de “nube” no se contabilizaron debido a que varios autores las han relacionado con apoptosis (Mañas y cols. 2006). El índice de daño al DNA (DICA) oscila entre 1 y 300 unidades arbitrarias y se calcula con la siguiente ecuación:

$$DICA = 0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3$$

Donde:

DICA = índice de daño al DNA

n_0, n_1, n_2, n_3 , = número de células en cada una de la categorías.

0,1, 2, 3 = valor del coeficiente que multiplica el número de células en cada categoría.

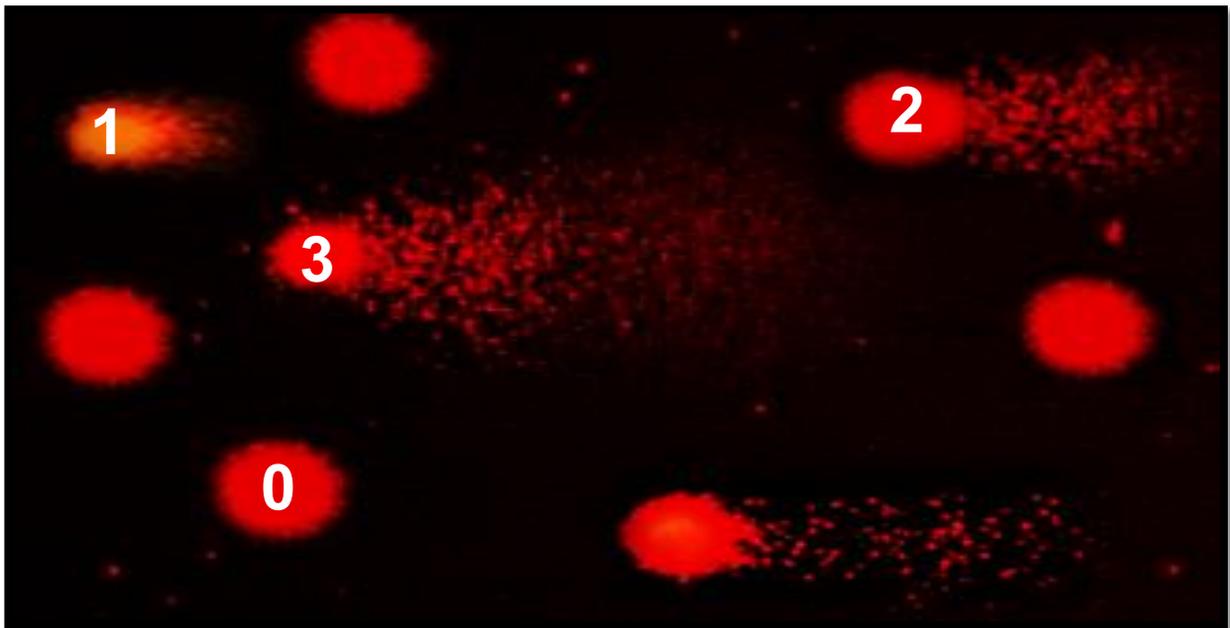


Figura 6. Moléculas de DNA de celomocitos de *Eisenia Foetida* por el ensayo cometa. Los números representan la categoría de acuerdo a la longitud de la cauda.

6.5 Determinación de compuestos orgánicos persistentes y metales en sedimento

Las muestras 290, 280 y 230 se analizaron con el apoyo de ECOSUR, Chiapas. El análisis de COPs se realizó por cromatografía de gases con espectrometría de masas (CGEM) (Hewlett Packard 6890) y el de metales por absorción atómica (PERKIN ELMER).

6.5.1 Cuantificación de COPs,

Un gramo de la muestra de sedimento se colocó en vasos Green-Chem y LEV del microondas, adicionándoles un carboflon, el estándar interno y 14 ml de cloruro de metileno. El programa de microondas consistió en 10 min de rampa para alcanzar 120 °C manteniéndose por 30 min. Al concluir la extracción los vasos se enfriaron a 4 °C por 24 h. Las muestras se filtraron con papel Whatman No. 1 y el filtrado se evaporó a 37 °C con corriente suave de nitrógeno hasta 4 ml. Con el fin de asegurar la eliminación de la acetona se adicionó 5 ml de hexano y continuó la evaporación hasta 2 ml. Posteriormente se realizó una limpieza con florisil y 1 g de Silica:H₂SO₄ 1:2, Los cartuchos de florisil (1000 mg/6 ml Phenomenex) se acondicionaron con 10 ml de hexano adicionados en 2 tiempos, evitando la sequedad del cartucho. Las muestras se evaporan con una corriente suave de nitrógeno a 37 °C, hasta tener un volumen de 0.5 ml y se aforó a 1ml con hexano.

El análisis cromatográfico fue realizado para cuantificar diclorodifeniltricloroetano (DDT) y su metabolito el diclorodifenildicloroetileno (DDE), así como 41 congéneres de bifenilos policlorados (PCBs): 17, 18, 28, 31, 33, 44, 49, 52, 70, 74, 82, 87, 95, 99, 101, 105, 110, 118, 128, 132, 138, 149, 151, 153, 156, 158, 169, 170, 171, 177, 180, 183, 187, 191, 194, 195, 201, 205, 206, 208 y 209.

Con soluciones estándares se obtuvo el espectro de masas y el tiempo de retención de DDT, DDE y de los 41 congéneres de PCBs utilizados por modo SCAN, para determinar los iones característicos de cada compuesto que serán utilizados para la cuantificación en las muestras, la cual se realizará por monitoreo selectivo de iones (SIM).

Las muestras se inyectaron por el método de split pulsado, con un programa de temperatura en el horno que inicia a 100 °C se mantiene 2 minutos, seguido de una rampa de 20 °C/min hasta 200 °C seguido de una rampa de temperatura de 15°C/min hasta 310 °C durante 5 min.

Las muestras fueron interpoladas en una curva de calibración la cual presentó un intervalo de concentraciones lineal de 2 a 100 ppb. Los límites de detección fueron de 0.6 a 2 ppb. Los porcentajes de recobro fueron de 78 % a 114 % para el estándar certificado de referencia EC-2 “A Lake Ontario Blended Sediment for Toxic Organics” del National Water Research Institute, Canadá.

6.5.2. Cuantificación de metales

Se cuantificó el metaloide As y los metales Cd, Pb y Hg. Las muestras fueron digeridas de la siguiente manera: en vasos de precipitado se colocó 500 mg de sedimento, 10 ml de ácido nítrico y 0.5 de ácido perclórico concentrado, se instalaron en parrillas de calentamiento a una temperatura máxima de 80 °C y se taparon con un vidrio de reloj. El procedimiento se realizó por duplicado. Una vez eliminada la materia orgánica, indicado por la desaparición de los humos blancos y quedando 1ml de la muestra, se le agregó ácido nítrico al 0.2 %, se pasó por un papel filtro Wathman No. 1 con capacidad de retención de partículas mayores a 11µm y se aforó a 25 ml para su lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica.

Como control de calidad se utilizó el estándar de referencia 2710 para sedimento avalados por el Nacional Institute of Standards and Technology (NIST). Los estándares y cada punto de la curva de calibración se digirieron simultáneamente con las muestras de sedimento (Parlak y cols. 2006, NOM-117-SSA1-1994, NMX-AA 051-SCFI-2001).

6.5.3 Cociente de peligro

Se obtuvo el cociente de peligro (CP) para cada compuesto mediante la siguiente fórmula:

$$CP = \frac{Ce}{Cr}$$

Donde:

CP= Cociente de peligro

Ce= Concentración de exposición

Cr= Concentración de referencia

Como concentración de referencia se utiliza la propuesta por la guía de calidad de Canadá (ISQG).

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó la prueba de Bartlett y Shapiro-Wilk para homogeneidad de varianzas y normalidad, respectivamente para las variables de cito y genotoxicidad.

Para citotoxicidad los datos resultaron no paramétricos por lo que se aplicó la prueba de Kruskal Wallis seguido por la prueba de Dunn con una $p < 0.05$. Para genotoxicidad los datos fueron paramétricos y se analizaron con ANOVA y Tukey $p < 0.05$.

Se realizó un análisis de regresión para obtener curvas concentración- respuesta de los sedimentos 230 y 280.

Se empleó el método probit para obtener la concentración efectiva CE_{27} para citotoxicidad y CE_{23p} para genotoxicidad.

8.1. Inspección y selección de sitios de muestreo

Se realizó la inspección de acuerdo a la metodología de evaluación de riesgo integrado (Mejía y cols. 2004, Torres-Dosal y cols. 2006), para seleccionar los puntos de muestreo, considerando las fuentes de contaminación y/o descargas urbanas, agrícolas e industriales, la accesibilidad del terreno y distancia de 0.5 a 1 km entre cada punto. El recorrido se llevó a cabo los días 24 y 25 de febrero del año 2011. En la Figura 7, se muestra la ubicación de cada punto de muestreo, los cuales se describen a continuación:

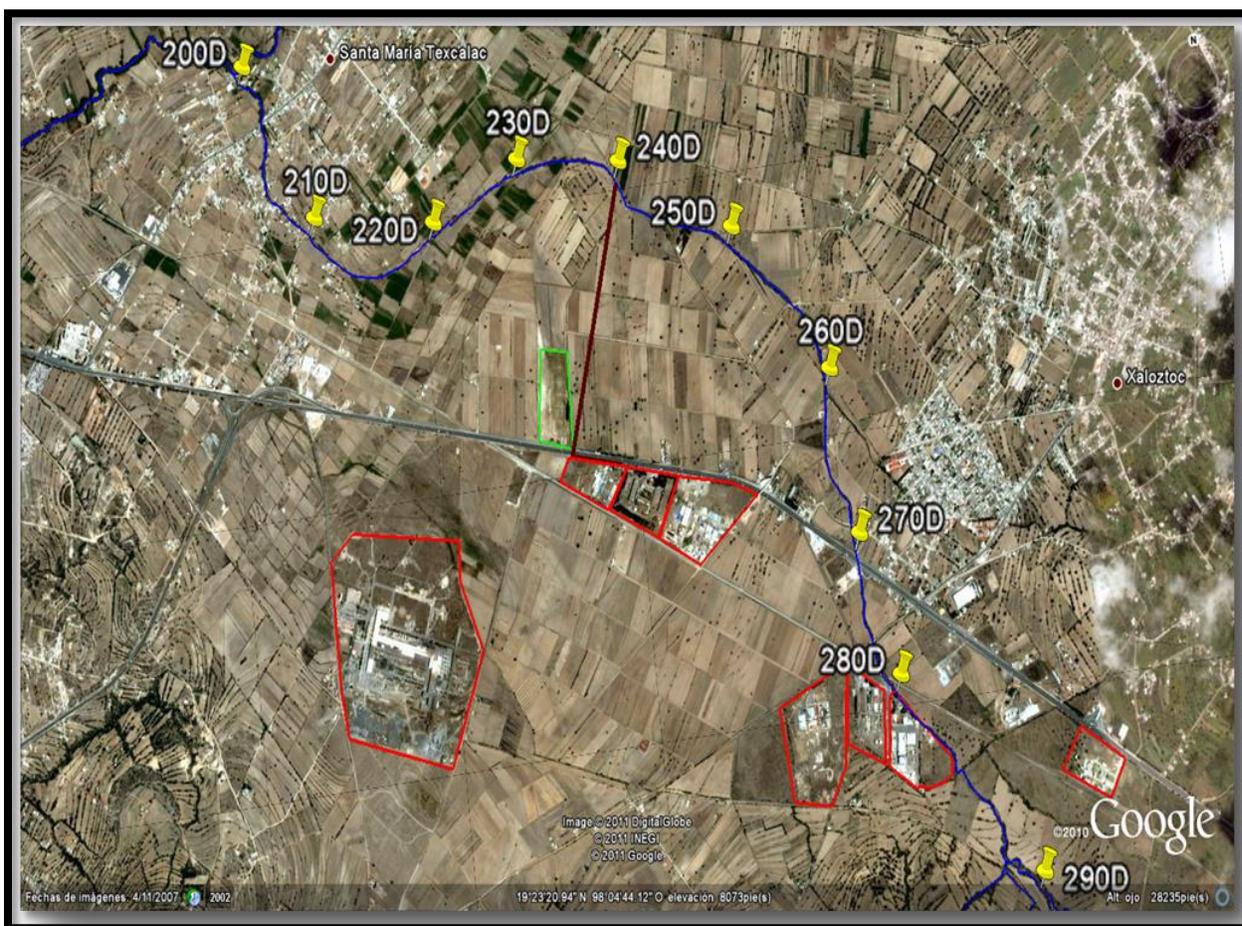


Figura 7. Ubicación de los puntos de muestreo de la Barranca Sambrano y de las industrias. Industria química del Istmo (A), Poliestireno y derivados (B), Industrias derivadas del etileno (C), Síntesis orgánicas (D), Polaquimia (E), Forjas Spicer (F), Metapol (G), CIA Siderúrgica de California (H).

290: 2487 msnm, 19° 22' 58.5" N y 98° 03' 19.4" O. Se ubica al inicio de la barranca Sambrano, se consideró como sitio de referencia por no existir evidencia aparente de contaminación, antes de recibir descargas industriales o urbanas.

280: 2470 msnm, 19° 23' 28" N y 98° 3' 42.4" O. Se ubica después de descargas industriales.

270: 2461 msnm, 19° 23' 48.7" N y 98° 3' 47.1" O. Se localiza cerca de una zona urbana y diversas descargas, entre ellas la de una bloquera.

260: 2451 msnm, 19° 24' 24.2" N, 98° 3' 55.5" O. Este sitio fue elegido por la presencia de zonas agrícolas y urbanas, además de actividad de pastoreo.

250: 2450 msnm, 19° 24' 33.9" N, 98° 4' 7.5" O. Se ubica en zona agrícola, se percibió un olor a benceno y un color negro en agua y sedimento.

240: 2430 msnm, 19° 24' 47.7" N y 98° 4' 30.6" O. Se sitúa después de las descargas industriales, rodeado por terrenos de cultivo, algo peculiar fue la presencia de restos animales a la orilla del cauce.

230: 2431 msnm, 19° 24' 48.3" N y 98° 4' 47.7" O. En este punto se percibió el cambio en la coloración y olor del cauce, una zona de color negro y otra rojiza, con presencia de terrenos agrícolas de riego.

220: 2419 msnm, 19° 24' 41.1" N y 98° 5' 6.4" O. En este punto el agua es utilizada para terrenos de riego, aunado a esto, encontramos caballos en descomposición y esqueletos a la orilla del cauce.

210: 2420 msnm, 19° 24' 45.9" N y 98° 5' 32.4" O. Se observó la presencia de asentamientos urbano, niños jugando y animales pastando a la orilla del cauce.

200: 2417 msnm, 19° 25' 7.7" N y 98° 5' 42.4" O. Sitio ubicado antes de la confluencia de la barranca Sambrano con el río Texcalac, se identifican sitios de pastoreo y se percibieron partículas blanquecinas suspendidas en agua.

8.2. Caracterización fisicoquímica del sedimento

En la Figura 8, se expresan los resultados del potencial de hidrógeno y materia orgánica de sedimentos superficiales de la barranca Sambrano. Se observó un comportamiento ascendente, del inicio de la barranca hasta su confluencia con el río Texcalac, el pH va de ácido a moderadamente alcalino. Basado en la clasificación de la NOM-021-SEMARNAT-2000, el sitio más ácido fue el 290 ubicado al inicio de la barranca, con valor de 5.4. Los sitios medios de muestreo 280, 270, 260 y 250 se clasifican como neutros, mientras que los puntos ubicados al final del cauce, 240, 230, 220, 210 y 200 se catalogan como medianamente alcalinos.

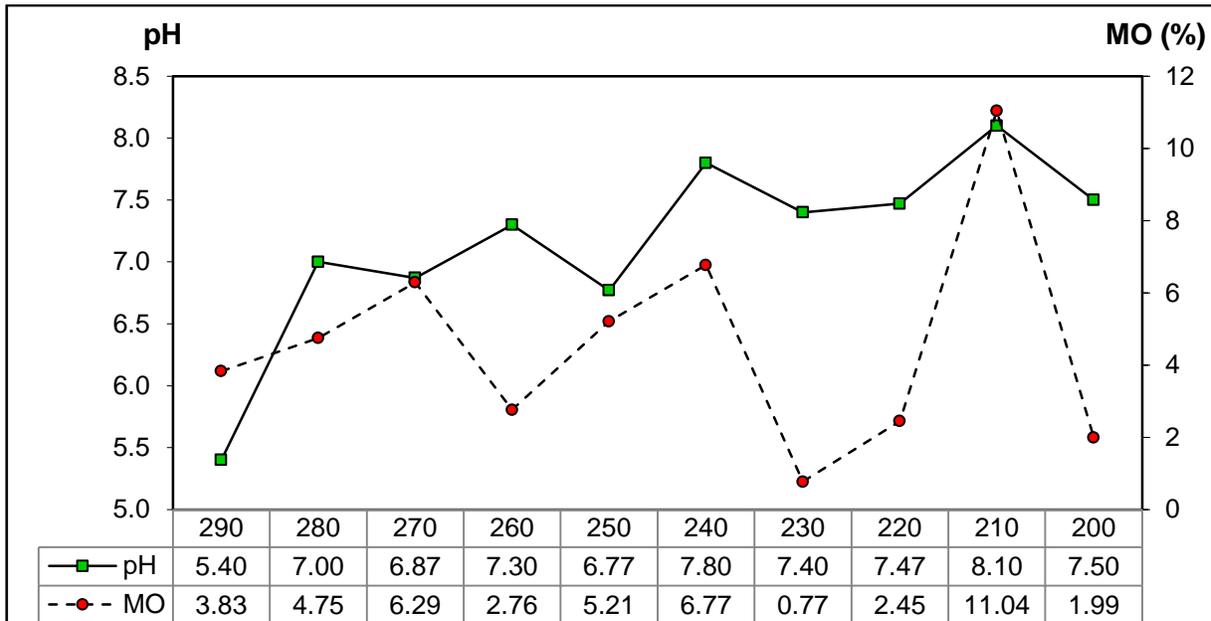


Figura 8. Potencial de hidrógeno y materia orgánica de sedimentos superficiales de la barranca Sambrano

En cuanto a materia orgánica los puntos 290, 280, 260, 250, 230, 220 y 200 presentaron porcentajes bajos de MO (< 6.0 %). Los puntos 270 y 240 se consideran con valores medios de MO, mientras que el punto 210 presentó el porcentaje más alto.

La CE de los sedimentos 290, 260, 240, 230, 220, 210 y 200, se clasifica como de baja salinidad y ligeramente salinos a los puntos 280, 270 y 250.

Las muestras 280, 230, 210 y 200 presentaron una CIC media (< 25 Cmol⁺/kg), mientras que un valor entre 25-40 Cmol⁺/kg considerado alto, se encontró en los sedimentos 290, 270, 260, 240 y 220, y muy alto el sedimento 250 (> 40 Cmol⁺/kg) de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000 (figura 9).

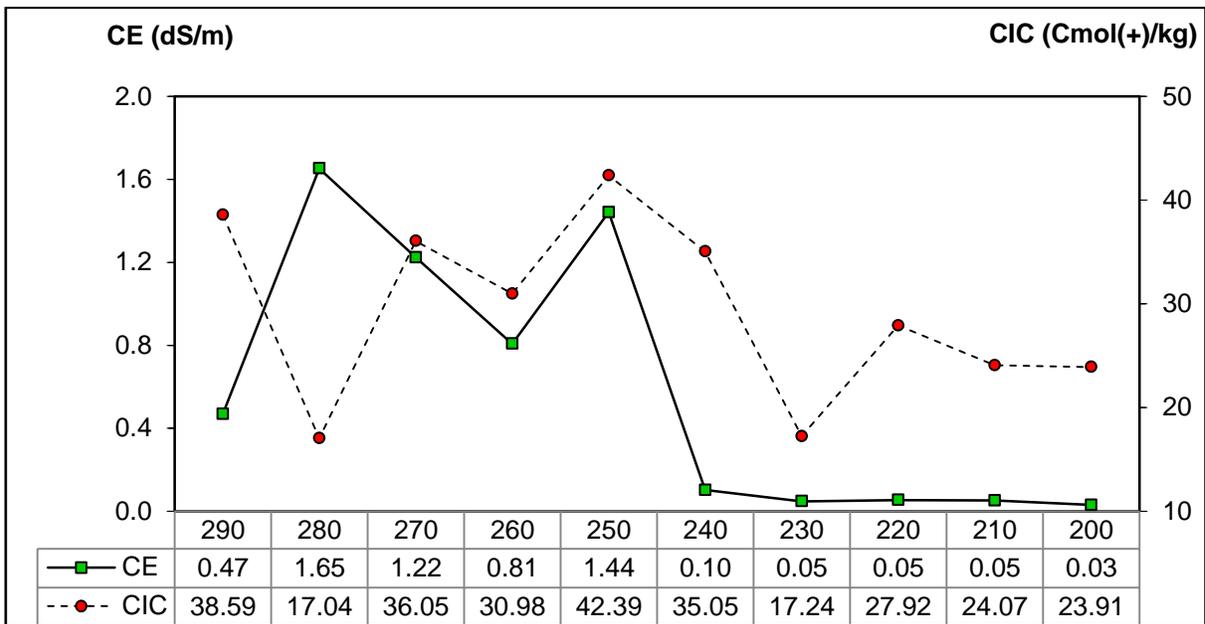


Figura 9. Conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico de sedimentos superficiales de la barranca Sambrano

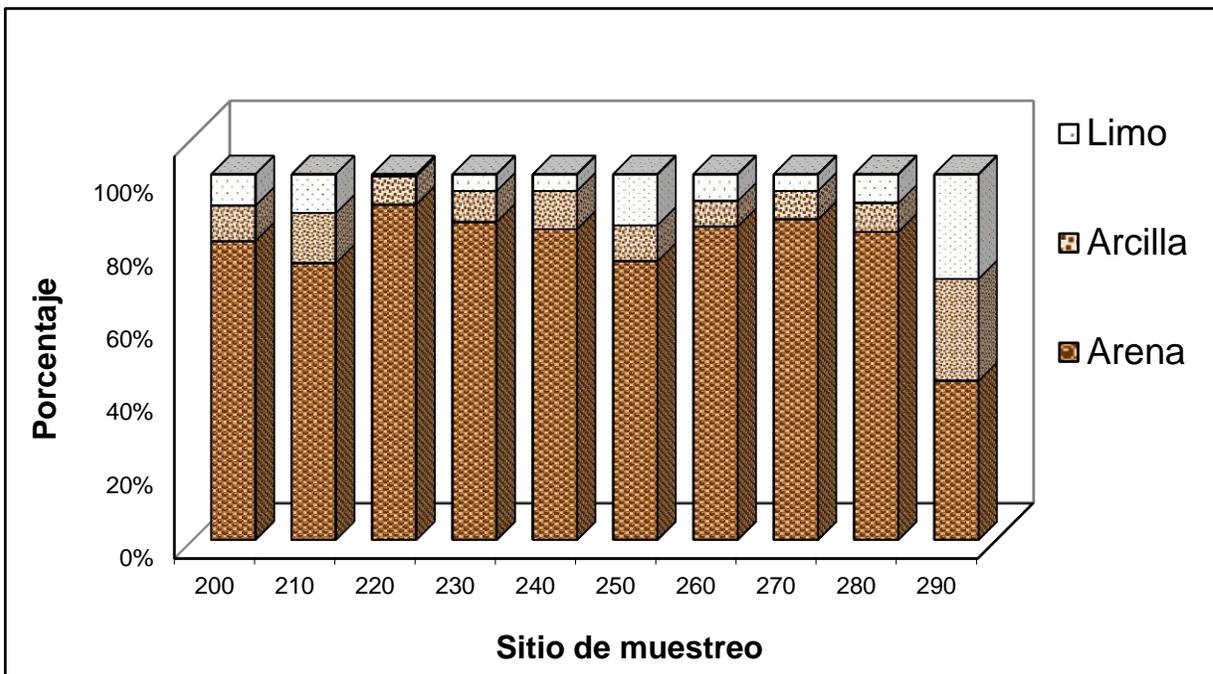


Figura 10. Porcentaje de arena, arcilla y limo de sedimentos superficiales de la barranca Sambrano.

La Figura 10 representa los porcentajes de arena, arcilla y limo de sedimentos superficiales de la barranca Sambrano. La textura de los sedimentos areno francosa fue la predominante en los puntos 280, 270, 260, 240, 230 y 200. Las muestras presentaron un porcentaje mayor de arena, a excepción del punto 290 con una textura franco arcilloso y una distribución homogénea de arena limo y arcilla.

8.3. Evaluación toxicológica del sedimento

Los resultados de la evaluación toxicológica se presentan a tres niveles de organización: molecular, analizando el índice de daño al DNA; celular, comparando la citotoxicidad de los celomocitos incubados con rojo neutro; e individual, evaluado el porcentaje de letalidad de *E. foetida* expuesta al sedimento directo (100 %) o diluido (60 % y 40 %).

8.3.1. Letalidad

La Figura 11 muestra los porcentajes de letalidad de los sedimentos superficiales, agrupados en tres niveles de toxicidad. El primer grupo es el comprendido por los sedimentos 290, 250, 200 y 270, en donde *E. foetida* mostró baja letalidad al exponerse al sedimento sin diluir, en los tres primeros no hubo letalidad y solo el cuarto mostró una letalidad del 53.3 %. El resto de los sedimentos fue 100 % letal para los organismos, por lo que se realizó una dilución con suelo previamente caracterizado con un contenido de 10 % de materia orgánica (Corona *et al* (2008), para disminuir el efecto de los sedimentos y obtener organismos vivos para las pruebas de cito y genotoxicidad. El segundo grupo quedó integrado por los sedimentos 280, 260, 210 que presentaron baja letalidad para *E. foetida* al diluirse al 60%, en donde solo el sedimento 210 mostró una letalidad del 65 %. El tercer grupo formado por los sedimentos 240, 230 y 220 los cuales tuvieron que diluirse al 40 % para obtener organismos vivos, aún a esta dilución el sedimento 220 produjo una letalidad del 30 %.

8.3.2. Citotoxicidad

En la prueba de citotoxicidad, los sedimentos mostraron absorbancias que superan de 1.5 a 2.7 veces el valor del TN, y todos excepto el 290 fueron estadísticamente significativos. Los sedimentos 200 y 270 resultaron ser los más citotóxicos del grupo sin diluir (figura 12).

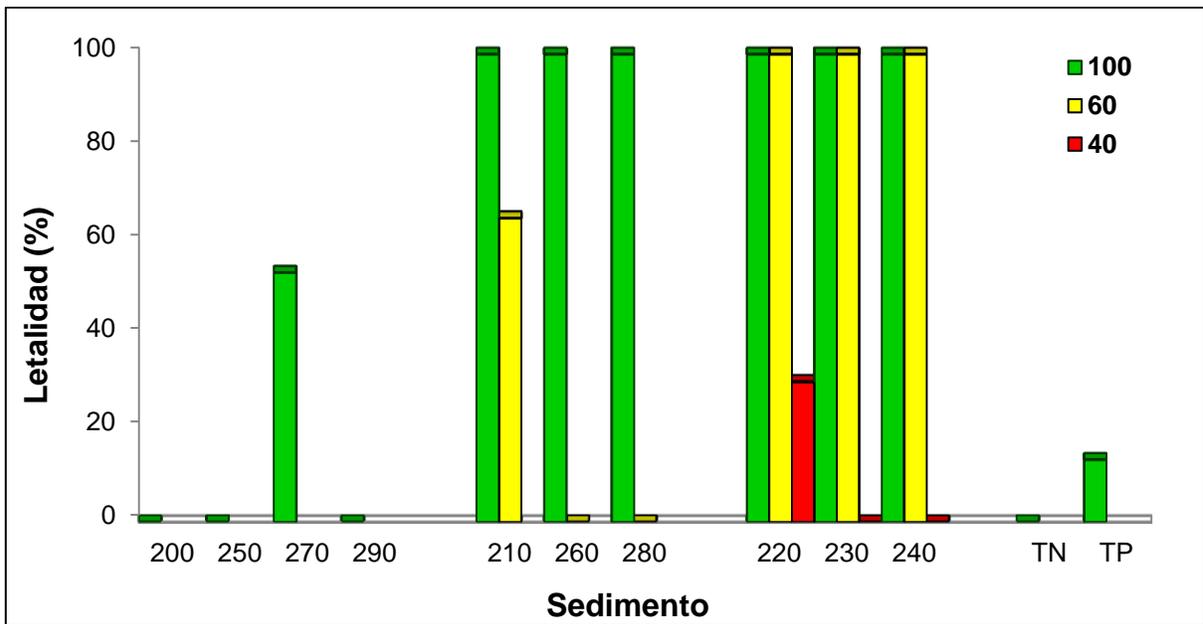


Figura 11. Letalidad de *Eisenia foetida* expuesta a sedimento superficial de la barranca Sambrano. Las barras representan el porcentaje de letalidad: verde, en sedimento sin diluir; amarillas, en sedimento diluido al 60 %; y rojas, en sedimento diluido al 40 %.

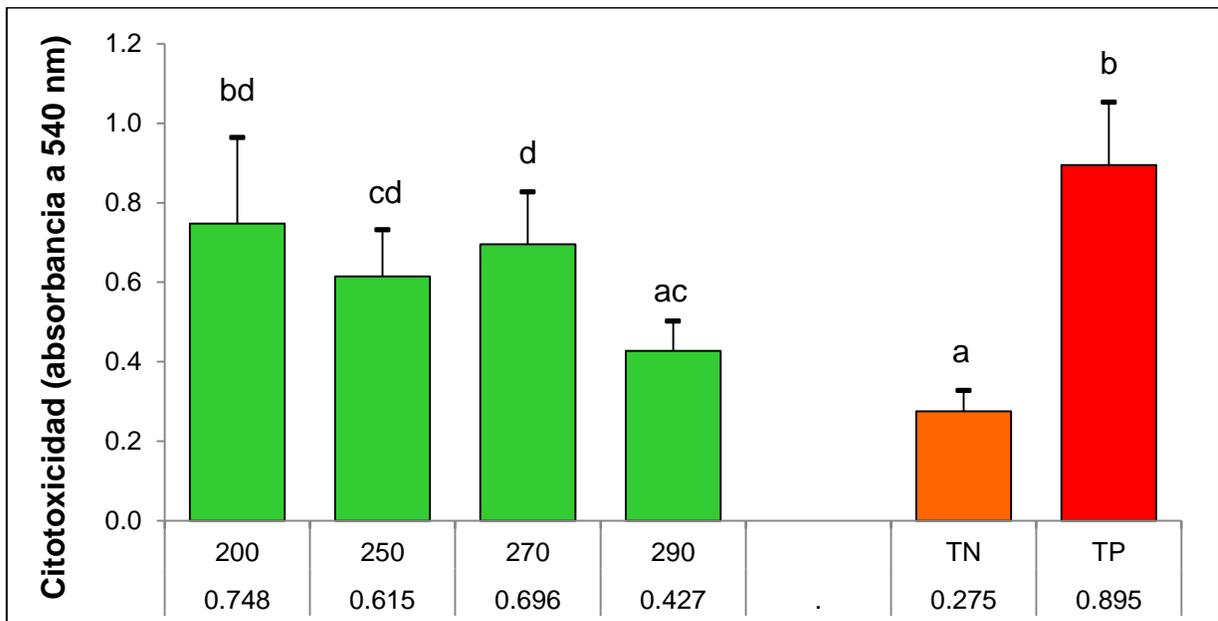


Figura 12. Citotoxicidad de celomocitos de *Eisenia foetida* expuestos a sedimento sin diluir (100%). Las letras desiguales representan diferencias significativas con Kruskal-Wallis y Dunn's $p < 0.05$.

El grupo de los sedimentos que requirieron ser diluidos al 60 % fueron capaces de inducir un daño superior y estadísticamente significativo, en donde las muestras 260 y 280 se consideran las más citotóxicas de este grupo con absorbancias 2.6 veces mayor que el TN (figura 13).

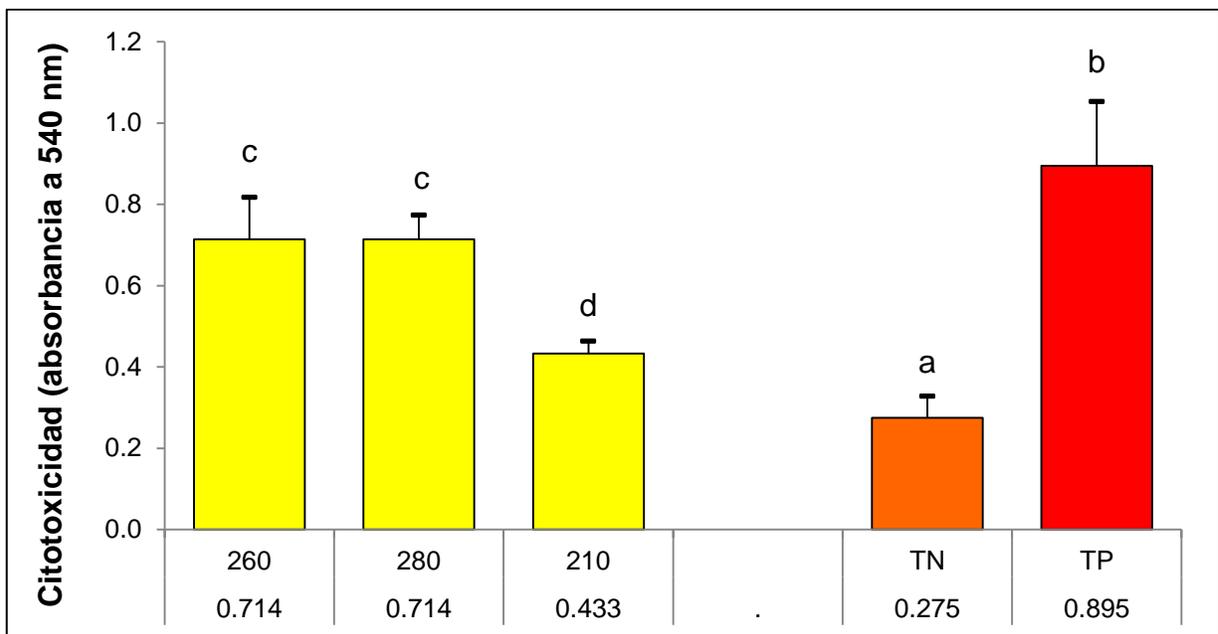


Figura 13. Citotoxicidad de celomocitos de *Eisenia foetida* expuestos a sedimento diluido al 60%. Las letras desiguales representan diferencias significativas con Kruskal-Wallis y Dunn's $p < 0.05$.

Por su parte los sedimentos del tercer grupo cuya elevada letalidad les requirió ser diluidos al 40 %, no mostraron citotoxicidad con respecto al TN (figura 14).

Las Figuras 15 y 16 representan las curvas concentración-respuesta citotóxica para el sedimento 230 y 280 con un efecto máximo en la dilución del 60 % de 0.433 ± 0.07 y 0.395 ± 0.02 respectivamente. La contribución de X^2 (230 = 0.0034 y 280 = 0.0015) fue menor al valor de X^2 para una $p < 0.05$ con $n-2$ grados de libertad (230 = 7.82 y 280 = 3.34) este resultado muestra que los datos se ajustan a una línea recta y es válido obtener la concentración efectiva. Mediante el método probit se obtuvo la concentración que produce un efecto citotóxico similar al testigo negativo (CE_{27}), el sedimento 230 resultó ser más citotóxico que el 280 al requerir ser diluido hasta un 6.2 ± 8.9 % para mostrar un absorbancia igual al testigo negativo (0.275 ± 0.05) comparado al 37.4 ± 8.3 % del sedimento 280.

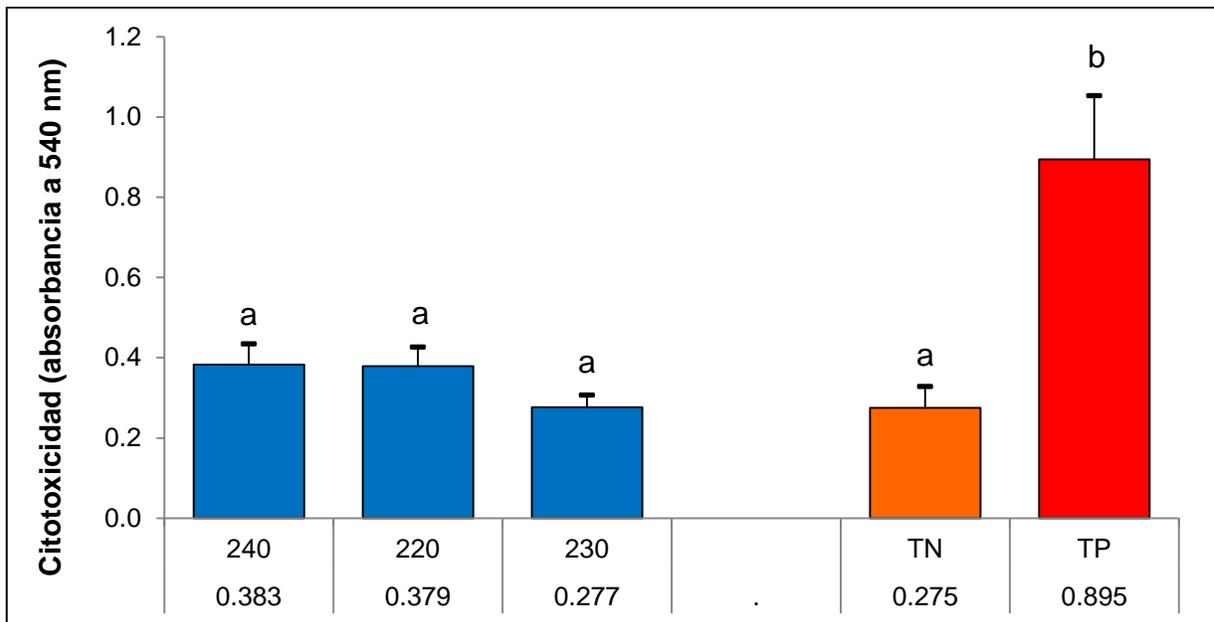


Figura 14. Citotoxicidad de celomocitos de *Eisenia foetida* expuestos a sedimento diluido al 40 %. Las letras desiguales representan diferencias significativas con Kruskal-Wallis y Dunn's $p < 0.05$.

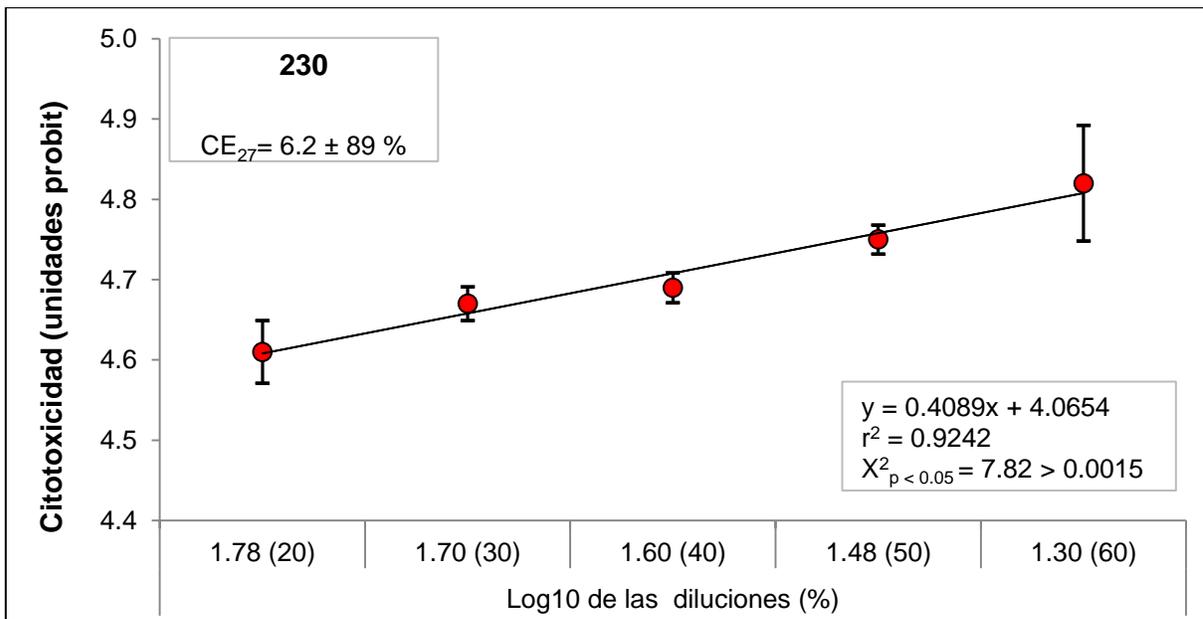


Figura 15. Curva Concentración-Efecto citotóxico del sedimento 230 de la barranca Sambrano.

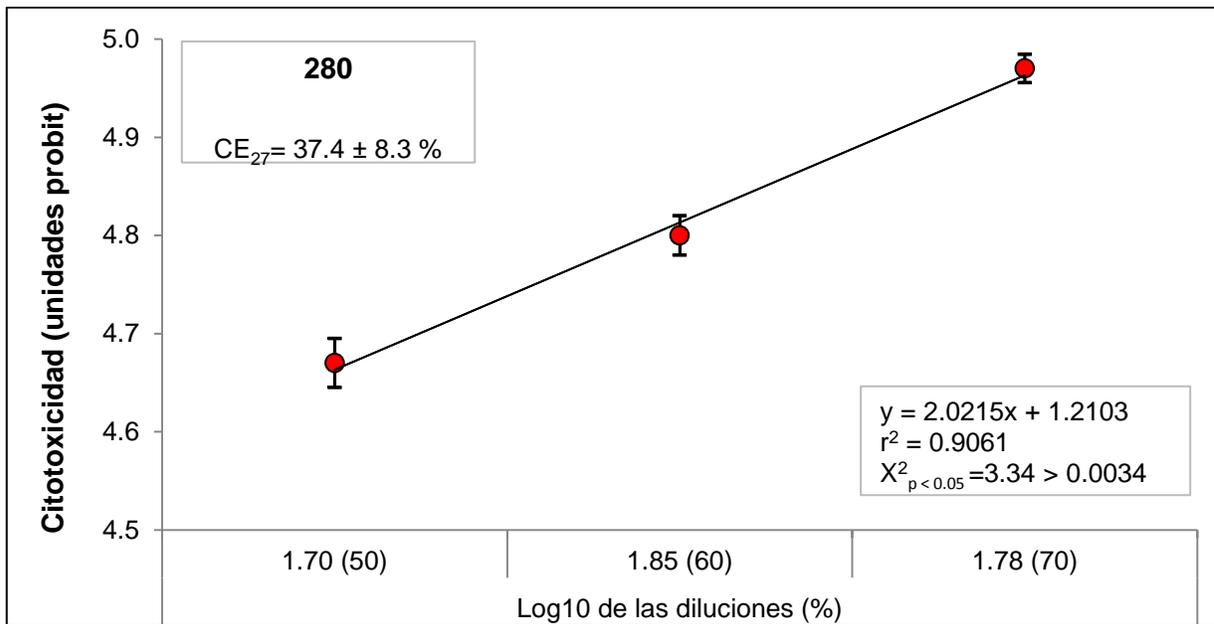


Figura 16. Curva Concentración-Efecto citotóxico del sedimento 280 de la barranca Sambrano.

8.3.3. Genotoxicidad

El sedimento 230 presentó el daño máximo con un DICA de 208.3 ± 8.6 , los tres sedimentos fueron significativamente superior a la fragmentación expresada por el TN (67.9 ± 21.8), no hubo diferencias significativas entre los sedimentos 290 y 280 (figura 17).

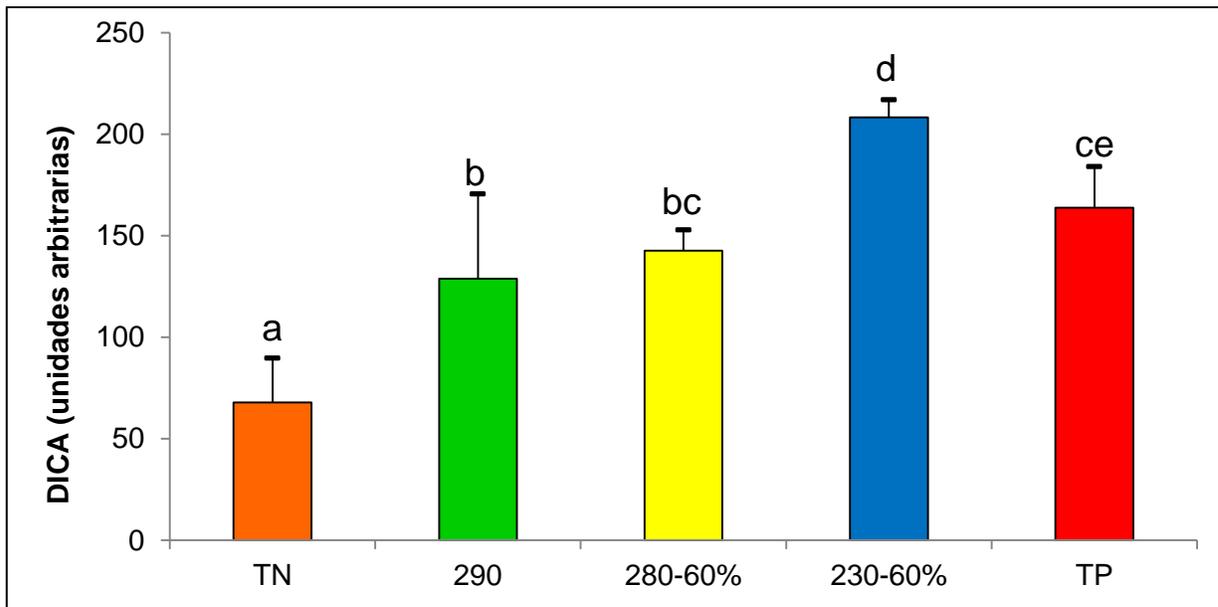


Figura 17. Comparación del DICA entre sedimentos de la barranca Sambrano. Las letras desiguales representan diferencias significativas con ANOVA y Tukey $p < 0.05$.

Las Figuras 18 y 19 representan las curvas concentración-respuesta genotóxica para el sedimento 230 y 280 con un efecto máximo en la dilución del 60 % de 208.3 ± 7.6 y 142.6 ± 9.3 respectivamente.

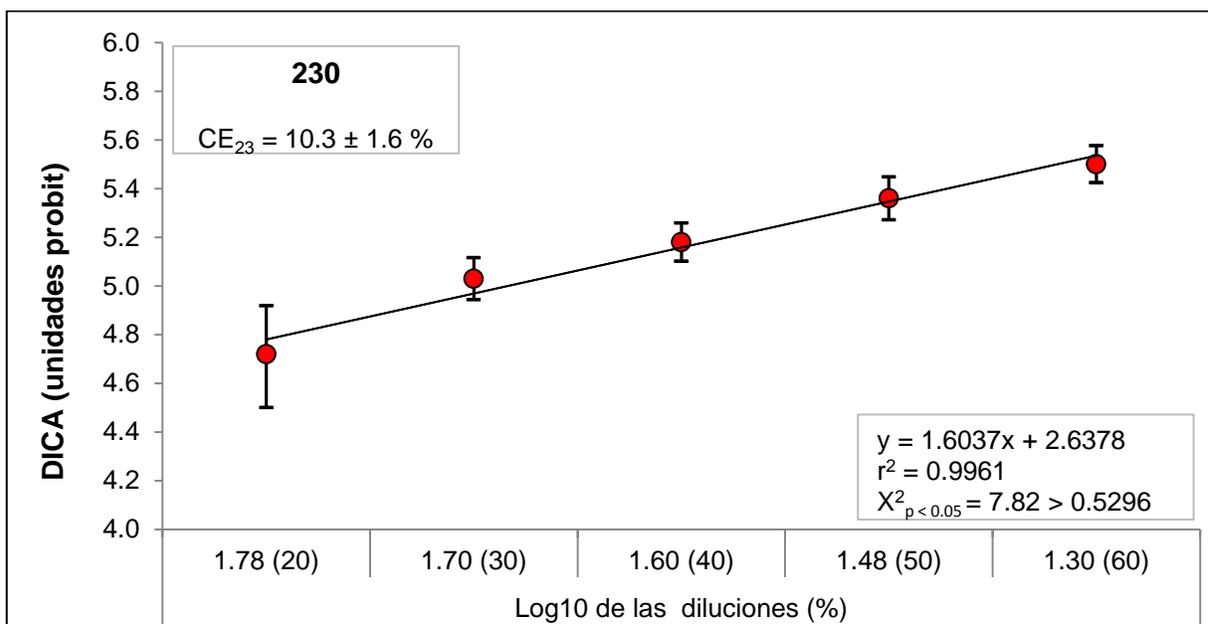


Figura 18. Curva Concentración-Efecto genotóxico del sedimento 230 de la barranca Sambrano.

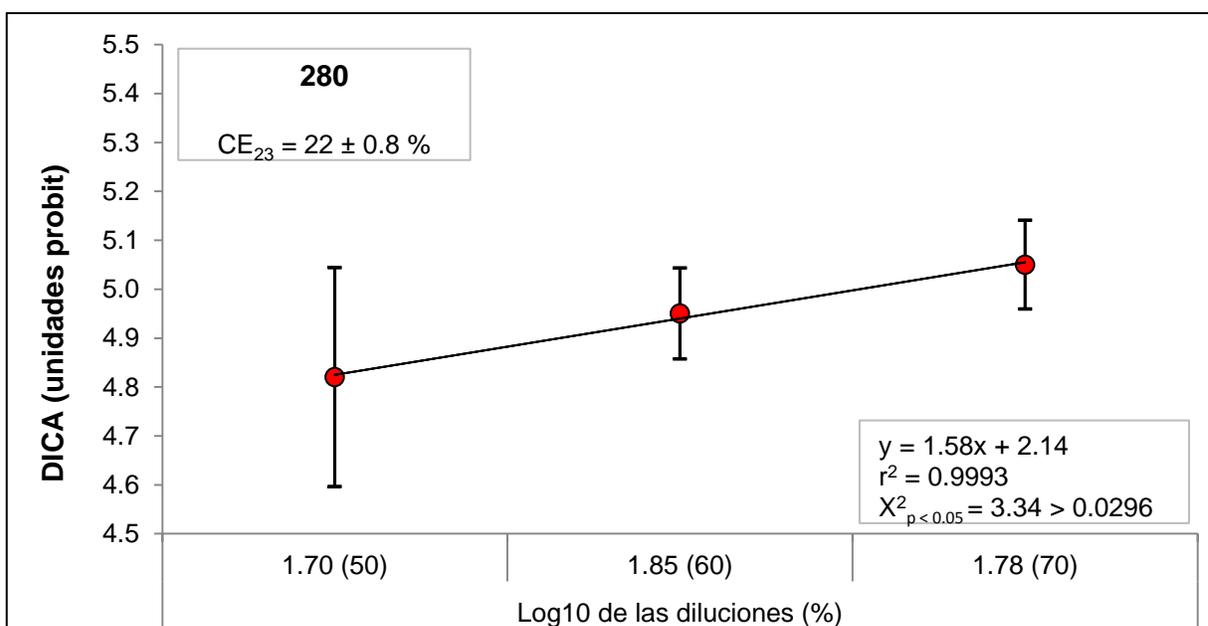


Figura 19. Curva Concentración-Efecto genotóxico del sedimento 280 de la barranca Sambrano.

La contribución de X^2 (230 = 0.5296 y 280 = 0.0296) fue menor al valor de X^2 para una $p < 0.05$ con $n-2$ grados de libertad (230 = 7.82 y 280 = 3.34) este resultado muestra el ajuste a una línea recta. Mediante el método probit se obtuvo la concentración que produce un efecto genotóxico similar al testigo negativo (CE_{23}), el sedimento 230 resultó ser más genotóxico que el 280 al requerir ser diluido hasta un $10.3 \pm 1.6 \%$ para mostrar un DICA igual al TN (67.9 ± 21.8) comparado al $22 \pm 0.8 \%$ del sedimento 280.

8.4. Determinación de compuestos orgánicos persistentes y metales

En la Figura 20 se observa el perfil de congéneres de PCBs en las muestras 290, 280 y 230 de sedimento superficial de la barranca Sambrano. El valor total de PCBs para la muestra 230 es de 93 941.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sobrepasando el límite de la Norma establecida por el Departamento de Protección Ambiental de New Jersey (70 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y la Norma del Ministerio Ambiental del Cónsul de Canadá (34.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) para la protección de la vida acuática. El cociente de peligro fue muy superior a la unidad lo cual representa un riesgo para la vida acuática con un valor de 2762 considerando la norma Canadiense.

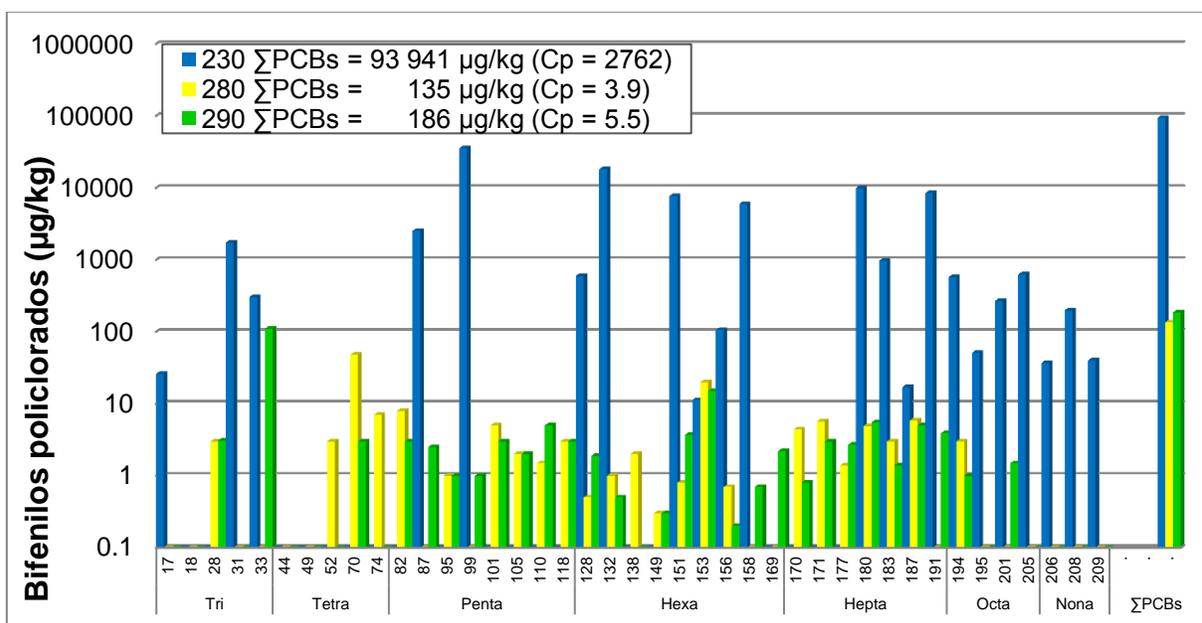


Figura 20. Perfil de congéneres de bifenilos policlorados en tres muestras de sedimento superficial de la barranca Sambrano. CP = cociente de peligro obtenido con base al ISQG (Interim freshwater sediment quality guidelines) de la norma Canadiense para la protección de la vida acuática.

Las concentraciones de 135.2 y 185.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para los sedimentos 280 y 290, respectivamente, sobrepasan las normas antes mencionadas. El CP tomando en cuenta la norma Canadiense es de 3.9 y 5.5 para los sedimentos 280 y 290, respectivamente.

El DDT se encontró en las tres muestras con valores de 0.3, 2.15 y 23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para las muestras 230, 280 y 290, respectivamente. Solo el sedimento 290 presentó valores por arriba de las normas para protección de la vida acuática. El CP fue de 3 considerando la norma de New Jersey (8 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y 19 tomando en cuenta la norma Canadiense (1.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$). El DDE solo se encontró en las muestras 230 y 290 con valores de 0.3 y 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente, valores por debajo del límite establecido por las normas (figura 21).

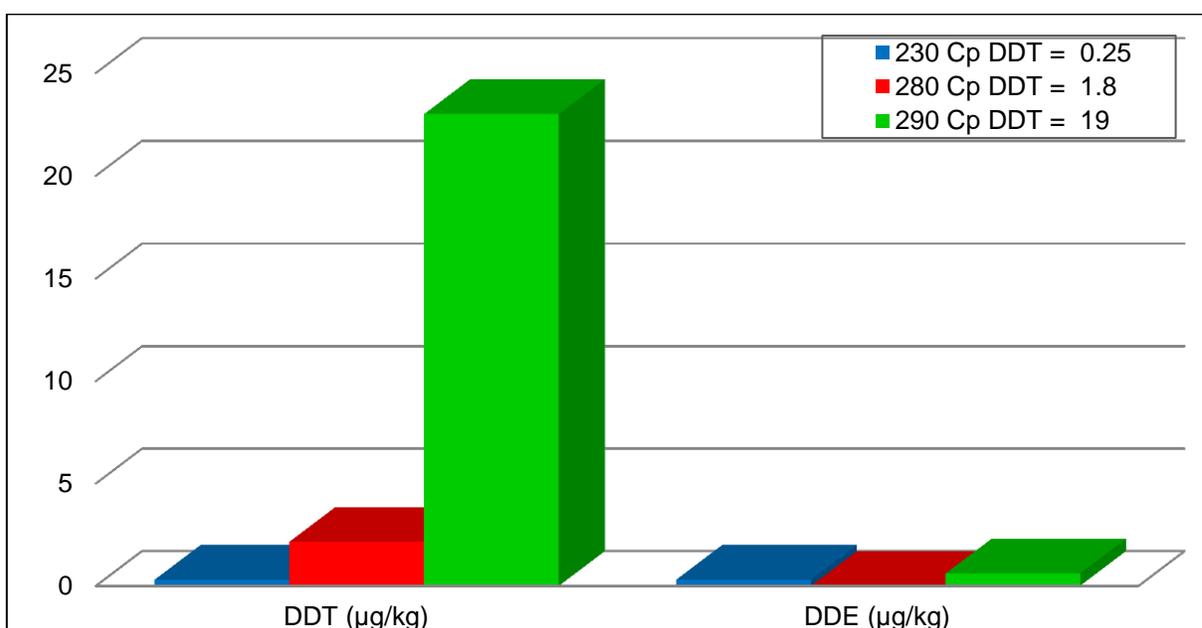


Figura 21. Niveles de DDT y su metabolito DDE en tres muestras de sedimento superficial de la barranca Sambrano. Cp = cociente de peligro obtenido con base al ISQG (Interim freshwater sediment quality guidelines) de la norma Canadiense para la protección de la vida acuática.

Las muestras 230, 280 y 290 presentaron valores de As de 2.79, 1.11 y 0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente, el Hg solo se detectó en la muestra 280 con 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$, el Cd se encontró en valores de 0.12, 0.17 y 0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y el Pb en 17.32, 8.43 y 3.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para 230, 280 y 290 respectivamente (figura 22), ninguno de los valores encontrados sobrepasaron los límites establecido por las normas de New Jersey y Canadá, con un cociente de peligro menor a 1.

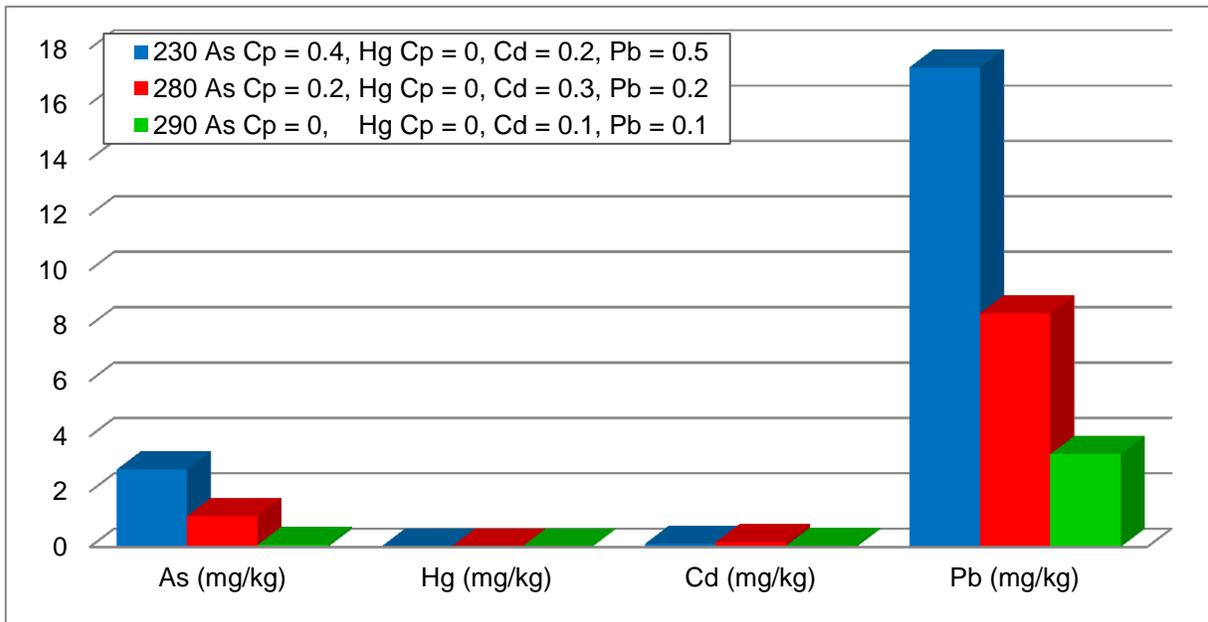


Figura 22. Niveles de metales pesados en tres muestras de sedimento superficial de la barranca Sambrano. Cp = cociente de peligro obtenido con base al ISQG (Interim freshwater sediment quality guidelines) de la norma Canadiense para la protección de la vida acuática.

9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los parámetros fisicoquímicos en la actualidad se han convertido en una herramienta complementaria dentro de los ensayos toxicológicos, ya que nos brindan información más precisa sobre el movimiento que tienen los contaminantes dentro de la matriz estudiada.

Un alto porcentaje de materia orgánica y arcilla, elevada capacidad de intercambio catiónico y conductividad eléctrica, implican, una mayor adsorción y retención de contaminantes aunado a un pH neutro que los estabiliza, bajo estas condiciones la movilidad y biodisponibilidad se ve reducida. Los compuestos orgánicos se adsorben en las cargas negativas de los minerales de arcilla de los sedimentos, si el porcentaje de materia orgánica es bajo como es el caso de la mayoría de los sedimentos de la barranca Sambrano la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes inmersos en los sedimentos será mayor.

El punto 210 fue el sitio que presentó el mayor porcentaje de MO proveniente en gran parte de las descargas urbanas ubicadas en la zona, esta característica indicaría mayor adsorción y retención de COPs, sin embargo, la movilidad y biodisponibilidad de los compuestos se ve favorecida por el pH alcalino, baja CIC y CE, y textura franco arenosa que en general presentaron el resto de los sedimentos.

Bajo estas condiciones los contaminantes como los COPs y metales se encuentran biodisponibles y presentan mayor movilidad hacia otras matrices ambientales, pueden regresar al medio acuático, disociarse como iones libres y participar en reacciones de intercambio catiónico con minerales y organismos vivos (Leal-Ascensio y cols. 2009), debido a que los COPs son semivolátiles pueden transportarse por aire y ser depositados en suelo, o bien entrar en la cadena trófica bioacumularse en plantas y animales, y biomagnificarse en organismos superiores.

Los enfoques tradicionales para evaluar la calidad de un ecosistema han puesto mayor énfasis en los componentes abióticos (suelo, sedimentos y agua), pero estos en determinado momento son insuficientes ya que falta información sobre los posibles efectos de estos componentes sobre los organismos. La exposición a mezclas complejas de sustancias contaminantes, especialmente cuando se producen en bajas concentraciones, no siempre producen efectos letales sobre los organismos, pero sí efectos subletales que pueden presentarse a niveles moleculares, bioquímicos y fisiológicos los cuales pueden influir en la supervivencia a largo plazo de las poblaciones (Pathiratne y cols. 2008).

La evaluación de efectos subletales sobre los sistemas biológicos como objetivo de la acción tóxica, junto con el análisis químico de muestras ambientales puede proporcionar mayor información acerca del bienestar de los ecosistemas. Su relación puede ser útil como herramientas de diagnóstico ambiental integrado y servirá para el desarrollo de estrategias de control y medidas de prevención de la contaminación (Pathiratne y cols. 2008).

La mayoría de las evaluaciones de riesgo ecológico se realizan a mezclas complejas a través de análisis químicos rutinarios, sin embargo, para hacer una evaluación adecuada de la contaminación del suelo, también se pueden usar bioensayos para evaluar rápidamente la exposición y demostrar los efectos potenciales de mezclas de compuestos con capacidad genotóxica (Xiao y cols. 2006).

La prueba de letalidad permitió agrupar a los sedimentos en tres niveles de toxicidad. El primer grupo de baja toxicidad comprendido por los sedimentos 200 y 290 ubicados al inicio y final de la barranca y los sitios 250 y 270 localizado en el centro, sin embargo el ensayo de rojo neutro para evaluar el daño a nivel celular demuestra capacidad citotóxica de los sedimentos con absorbancias que disminuyen en el siguiente orden $200 > 270 > 250 > 290$, los tres primeros estadísticamente significativos con respecto al testigo negativo, aunque el 290 no fue significativo el efecto citotóxico ocasionado a la membrana lisosomal de los celomocitos de *E. foetida* ocasionó no retención del rojo neutro en la célula presentándose como un incremento de la absorbancia casi al doble del testigo negativo. A pesar de que el sedimento 290 se consideró como un sitio de referencia, produjo un daño a nivel molecular sobre el DNA extraído de los celomocitos de *E. foetida*, con un DICA superior y significativo al TN.

En el segundo grupo de mediana toxicidad, se incluyen los sedimentos 280, 260 y 210 los cuales requirieron ser diluidos al 60 % para evitar la letalidad de *E. foetida*. El 280 se ubica cerca de una zona industrial, el 260 en región agrícola y el 210 en área urbana, y los tres presentaron un nivel de citotoxicidad superior y estadísticamente significativo con respecto al TN, la magnitud del efecto fue en el siguiente orden $280 = 260 > 210$, curiosamente el sedimento 210 presentó mayor letalidad, si bien esto parece incongruente puede ser posible debido a que los diversos mecanismos de toxicidad, la letalidad puede deberse a un efecto sistémico y no necesariamente a un daño de la membrana lisosomal que es lo que evalúa la técnica de rojo neutro. Con respecto a la genotoxicidad solo se evaluó el sedimento 280 el cual

aún diluido fue capaz de inducir daño al DNA con el doble de la magnitud que el testigo negativo.

Finalmente, el tercer grupo de elevada toxicidad se conformó por los sedimentos 220, 230 y 240 que tuvieron que ser diluidos al 40 % para obtener organismos vivos. Estas tres muestras no se encuentran dispersas como los dos grupos anteriores, están continuas y ubicadas en una zona agrícola. El sedimento 220 resultó ser el más agresivo con un valor de letalidad del 30 %, en la prueba de citotoxicidad no se observa diferencias entre los tres y solo a esta dilución no mostraron daño lisosomal con respecto al testigo negativo, sin embargo la prueba del ensayo cometa demuestra que el sedimento 230 es el más genotóxico, con un DICA de 208, superando los sedimentos 280 (sedimento diluido al 60 %) y 290 (sedimento sin diluir), e incluso al testigo positivo con un índice de daño de 143, 129 y 164 respectivamente.

Las curvas concentración-efecto citotóxico y efecto genotóxico reafirman que el sedimento 230 es más tóxico que el 280. La muestra 230 requiere diluirse hasta un 6.2 % para citotoxicidad y 10 % para genotoxicidad, y así mostrar un efecto similar al TN, contra un 37 % y 22 % para el sedimento 280.

La evaluación a tres niveles de toxicidad (individuo, celular y genotoxicidad), permitió diferenciar entre sedimentos e identificar indirectamente áreas de mayor y menor contaminación. Una zona de menor contaminación (efectos moderado) localizada al inicio de la barranca, una zona de alta contaminación (efectos severos) ubicada en una zona agrícola, posiblemente relacionada con descargas puntuales.

La capacidad de los sedimentos para causar daño a *E. Foetida* puede estar relacionada con los agentes químicos que se descargan a la barranca Sambrano, la determinación analítica de tres muestras (290, 230 y 280), correspondientes a cada uno de los grupos de baja, alta y toxicidad media, demuestra la presencia de bifenilos policlorados que superan la norma canadiense de protección de la vida acuática, con una alarmante concentración de PCBs en el sedimento 230 (93 941 µg/kg), ubicado en el grupo de elevada toxicidad lo cual refuerza la hipótesis de descargas puntuales en esta zona.

Juárez-Santacruz y cols. (2013) reportan niveles de PCBs en sedimentos del río Zahuapan y Atoyac que oscilan de 80 a 1876 µg/kg, ubicándose el valor más alto en el río Atoyac, Espinoza-Reyes y cols. (2010) reportan concentraciones promedio de PCBs en suelo

del área industrial de Coatzacoalcos de 600 µg/kg. El nivel encontrado en el sedimento 230 supera por mucho los valores reportados por estos autores.

Fue sorprendente el hallazgo DDT en el sedimento 290, éste se ubica al inicio de la barranca Sambrano y se consideró como sitio de referencia. El uso agrícola de este plaguicida fue prohibido en México desde 1998, además de que Tlaxcala no es una zona endémica de paludismo (el DDT aún está autorizado para uso en campañas sanitarias), si bien, el DDT es un compuesto persistente que viaja a grandes distancias, lo más lógico sería encontrar su metabolito (DDE), este hallazgo sugiere el uso clandestino y reciente en el Estado, o transporte eólico de zonas agrícolas de la región e incluso de otros estados. La concentración de DDT en el sedimento 290 (23 µg/kg) es relativamente baja comparada con otros sitios. Waliszewski e Infanzón (2003) reportan niveles para suelo agrícola en Puebla de 65 µg/kg, mientras que en suelos y polvo de Chiapas (zona endémica para paludismo) las concentraciones fueron de 26.98 mg/kg y 2119.8 mg/kg, respectivamente (Martínez-Salinas y cols. 2011). Chen y cols. (2004) evaluaron tierras de cultivo regadas con efluentes de una planta de tratamiento de aguas residuales y de aguas residuales sin tratamiento, cuantificando plaguicidas organoclorados como isómeros de HCH, aldrín, endosulfan y DDT y sus metabolitos, encontrando cantidades totales de COPs desde 6.69 hasta 534 µg/kg.

Cabe mencionar que la barranca Sambrano no es el único sitio que reporta DDT, en suelo agrícola del municipio de Cuapiaxtla, y en el Carmen Tequexquitla, en cultivos cercanos a una industria que utiliza como materia prima clorobencenos, se reportan la presencia de DDT, endosulfán, y hexaclorobenceno (Hernández-Zamora y cols. 2006). Juárez Santacruz y cols. (2013), reportan concentraciones de 18 µg/kg de DDT en la sierra de Tlaxco, curiosamente zona no impactada por actividades humana lo que refuerza la hipótesis de que el valor encontrado en el sedimento 290 es por transporte eólico.

Los COPs y algunos metales se depositan en la fase sedimentaria y son capaces de alterar la estabilidad de la membrana lisosomal de *E. foetida* en respuesta al estrés causado por dichos xenobióticos, manifestándose con la salida del rojo neutro de los lisosomas al citoplasma; Sánchez-Hernández (2006) menciona que durante la exposición se activan mecanismos de respuesta como actividades catalíticas y enzimáticas, involucradas en el metabolismo xenobiótico como glutatión-S-transferasa (GST) e incremento de la peroxidación lipídica, que tras su activación generan especies reactivas de oxígeno (EROS), que generan la

formación de lípidos hidroperóxidos provenientes de los ácidos grasos polinsaturados de membrana, causando alteración en la integridad y función de la misma (Abuja y Albertini 2001).

La presencia de contaminantes en sedimento, no solo implica afectaciones a nivel celular, sino a nivel de biomolécula. Los daños celulares ocasionan un citosol muy denso, mitocondrias condensadas, retículo endoplásmico ligeramente dilatado, cromatina del núcleo acumulada a lo largo de la envoltura y alrededor del nucléolo, contorno del núcleo irregular y fragmentación nuclear. Todo esto desencadena la activación de proteasas, endonucleasas y fosfolipasas. La activación de endonucleasas provoca roturas sencillas y dobles del DNA, así como aumento de los niveles de p53, y poli-ADP riboxilación y de proteínas nucleares esenciales para la reparación del DNA. La activación de proteasas modifica sustratos, como actina, proteínas conexas (formación de vesículas), y poli ADP ribosa polimerasa (PARP), que inhibe la reparación del DNA (Silbergeld 2001).

El valor de DDT sobrepasa los límites establecidos por la norma Canadiense para la protección de la vida acuática con un cociente de riesgo de 19. La exposición crónica por vía inhalatoria de ratas Wistar a 7 mg/m^3 de DDT, mostró un incremento significativo en la frecuencia de MN y la fragmentación del DNA en linfocitos, mucosa oral y células de mama demostrado el efecto genotóxicos de este compuesto (Canales-Aguirre y cols. 2011).

Los valores de metales en las muestras se reportaron por debajo de la norma Canadiense para la protección de la vida acuática. Sin embargo, los niveles encontrados de As (2.8 mg/kg) y Pb (17 mg/kg) en la muestra 230, deben ser tomados en cuenta. Un estudio realizado en la laguna el Limón, reportó que niveles bajos de metales en sedimento de As = 1 mg/kg, Cd = 2 mg/kg, Cr = 138 mg/kg, y Pb = 30 mg/kg), pueden llevar a la pérdida en la productividad del desarrollo de especies (flora y fauna nativa) y eventos masivos de mortandad de peces (Leal-Ascencio y cols. 2008).

Los resultados de este estudio demuestran la eficiencia del uso de bioindicadores y bioensayos para evaluar escenarios potencialmente peligrosos como una herramienta de apoyo en las primeras etapas de la metodología de evaluación de riesgo y que complementa el análisis químico de matrices ambientales. La presencia de PCBs en el sitio 230 implica un riesgo latente para la biota. Gichner y cols. (2007), demuestra bioacumulación de PCBs en plantas de tabaco (28 mg/kg en hojas y 308 mg/kg en raíz) cultivadas en un suelo contaminado

con 265 mg/kg de PCBs, así como un incremento en el daño al DNA y reducción en el crecimiento de la planta.

En época de estiaje el sedimento queda a la intemperie, siendo fácilmente erosionado y transportado a otra matriz ambiental, además el agua de la barranca es utilizada para riego en algunas zonas agrícolas, durante este proceso el sedimento superficial es removido y los cultivos irrigados se vuelven receptores de los contaminantes, incrementando la probabilidad de bioacumulación en flora y fauna de consumo humano y por ende biomagnificación en organismos superiores incluyendo al hombre.

Los resultados de este trabajo sugieren evaluar la zona de mayor toxicidad en donde se ubican los sedimentos 220, 230 y 240, aplicando biomarcadores de exposición en biota y estrategias para disminuir la exposición.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadía A, Eleizalde Ma B, Heras L y Montañes L. 1980. Comparison of two methods for determination of the cation Exchange capacity in calcareous soils. *An Aula Dei* 15: 126-137.
- Abuja, PM y Albertini, R. 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 306:1-17.
- Andreotti C y Gagneten AM (2006) Efectos ecotoxicológicos del sedimento del río Salado inferior (Argentina) en la supervivencia y reproducción de *Moina micrura* (Crustacea, Cladocera). *Revista Toxicológica* 23; 146-150.
- Anto MN, Sánchez MJC, García FM y Amaya CA. 2008. Actividad Colinesterásica en *Eisenia fetida* expuesta a diferentes concentraciones de plaguicidas carbámicos en un suelo artificial. VII Congreso Nacional de Toxicología. 3-6 p. UAEM.
- Andreotti C y Gagneten AM. 2006. Efectos ecotoxicológicos del sedimento del río Salado inferior (Argentina) en la supervivencia y reproducción del *Moina micrura* (Crustácea, Cladóceras). *Revista de toxicología* 23: 146-150.
- Arbeli Z. 2009. Biodegradation of persistent organic pollutants (POPs): I the case of polychlorinated biphenyls (PCB). *Acta biol* 14(1): 57-88
- Arencibia DFA, Rosario FLA y Curveco SDL. 2003. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad en revista de toxicología en línea.
- Arencibia ADF y Rosario FLA. 2010. La rata Sprague Dawley como biomodelo en la inducción de micronucleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *Retel*, revista toxicológica en línea 1-15.
- Arencibia ADF, Rosario FLA, Morffi FJ y Curveco SDL. 2009. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Retel* 23(3): 23-40.
- Arrebola MJP. 2007. Evaluación de la exposición humana a compuestos orgánicos persistentes e identificación de factores de riesgo. Memoria para grado doctoral. Universidad de granada
- ATSDR, 2008. Agencia para las Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. 2008. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos en <http://www.atsdr.cdc.gov>
- ATSDR, 2010. Agencia para las Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. 2010. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos en <http://www.atsdr.cdc.gov>
- ATSDR, 2000. Toxicological profile for Polychlorinated Biphenyls (PCBs). Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry.
- Brigden K, Labunska I, Santillo D y Johnston P. 2010. Vertidos en la cuenca Matanza-Riachuelo, Buenos Aires: Parque Industrial Burzaco y Planta de tratamiento de efluentes cloacales de AySA. Nota técnica del laboratorio de investigación de Greenpeace.
- CalisiA, Lionetto MG y Schettino T. 2009. Pollutant-induced alterations of granulocyte morphology in the earthworm *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (5): 1369-1377.
- Candela LL. 2002. Contaminación de las aguas subterráneas: Tipo doméstico e industrial. Presente y futuro de las aguas subterráneas en la provincia de Jaen. ©IGME. Madrid, ISBN. 84-7840-472-4

- Canales-Aguirre A, Padilla-Camberos E, Gómez-Pinedo U, Salado-Ponce H, Feria-Velasco A y De Celis R. 2011. Genotoxic effect of chronic exposure to DDT on lymphocytes, oral mucosa and breast cells of female rats. *Int J Environ Res Public Health* 8: 540-553.
- Carballo HO, Arencibia CG, Concepción J y Isla MM. 2003. Los bioensayos de toxicidad en sedimentos marinos. *Revista de toxicología en línea*. En <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>. 33-69.
- Cardini J. 2010. Dispersión de contaminantes en cuerpos receptores (aguas superficiales). UTN- regional concepción del Uruguay.
- Cervantes M. 2007. Conceptos fundamentales sobre ecosistemas acuáticos y su estado en México. En *Perspectivas sobre conservación de ecosistemas acuáticos en México*. INE-SEMARNAT, 37-67.
- Chen Y, Wang Ch, Wang Z y Huang S. 2004. Assessment of the contamination and genotoxicity of soil irrigated with wastewater. *Plant and soil* 261:189-196.
- Clavería CCL. 2005. Estudio para producir harina a partir de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) para ser utilizada en la elaboración de concentrados para animales de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. 130.
- Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía y las Universidades de Sevilla, Granada y Huelva. 2003. Informe final sobre la contaminación de suelos por compuestos orgánicos.
- Corona VD, Cram HS y Rojas CE. 2008. Ensayo de genotoxicidad con la lombriz de tierra *Eisenia andrei* en Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. 233-273.
- Cussi SFR. 2010. Manual de procedimientos “Laboratorio de Toxicología ambiental”, Escuela militar de ingeniería.
- Díaz-Barriga F. 1999. Metodología de identificación y evaluación de riesgos para la salud en sitios contaminados. OPS/CEPIS. Agencia Alemana de Cooperación Técnica 42 p.
- Di Marzio WD, Saenz ME, Lelière S, Vasseur P. 2005. Improved Single-Cell Gel Electrophoresis Assay for Detecting DNA Damage in *Eisenia foetida*. *Environmental and molecular mutagenesis* 46:246-252.
- Di Marzio WD, Sáenz ME, Alberdi JL. 2008. Evaluación de la Ecotoxicidad de efluentes industriales y municipales: Caso de estudio Río Luján – Región Ciudad de Pilar. *Revista de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, 100: 102 – 105.
- Enriquez AP. 2001. Evaluación de riesgo ambiental a la liberación de plaguicidas. Ministerio de salud del Perú, Lima, 111p.
- Espinosa-Reyes G, Ilizaliturri CA, González-Mille DJ, Costilla R, Díaz-Barriga F, Del Carmen CM, Martínez MA, Mejía-Saavedra J. 2010. DNA damage in earthworms (*Eisenia spp.*) as an indicator of environmental stress in the industrial zone of Coatzacoalcos, Veracruz, México. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 45: 49-55.
- Fourie, F, Reinecke, S.A, Reinecke, A.J. 2007. The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67 (3), 361–368.
- Förstner U. 2004. Traceability of sediments analysis. *Trac trends in analytical chemistry* 23(3): 217-236.
- García-Nieto E, Carrizales-Yañez L, Juárez-Santacruz L, García-Gallegos E, Hernández-Acosta E, Briones-Corona E y Vázquez-Cuecuecha OG. 2011. Plomo y arsénico en la

- subcuenca del alto Atoyac en Tlaxcala, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Ambientales y del Ambiente* 17(1): 7-17.
- Gastaldi L, Ranzato E, Capri F, Hankard P, Pérez G, Canesi L, Viarengo A y Pons G. 2007. Application of a biomarker battery for the evaluation of the sublethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia Andrei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology & Pharmacology* 146(3):398-4.
- Gil HF. 2000. El papel de los biomarcadores en Toxicología humana. *Revista de toxicología* 17(1):19-26.
- Goyberg-Reín GE y Vázquez AA. 2003. Análisis químico: Manual de prácticas. Universidad autónoma de Chapingo 85-88.
- Hernández HS, OC Franco, CC Herrera. 2008. Carbono orgánico y materia orgánica en sedimentos superficiales de la bahía concepción. *Ciencia ... Ahora* N°21 Año 11 Marzo a septiembre 2008
- Hernández MA, Velasco JA, Rojas F, Campos RE, Lara VH, Torres JA y Salgado MA. 2003. Absorción de compuestos orgánicos volátiles en arcilla del estado de Puebla, México. *Revista Internacional de Contaminación ambiental* 19(004): 191-196.
- Hernández-Zamora F, Roldán-Martín A, Cruz-Colín R, Castañeda-Briones M y Rodríguez-Vázquez R. 2006. Evaluación de la toxicidad de un suelo contaminado con plaguicidas organoclorados antes y después del tratamiento de biolabranza. XV Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. EXPO Guadalajara 1-11.
- INE, 2004. Instituto Nacional De Ecología. El lindano en México. Instituto Nacional de Ecología. México 67 p. (En línea). Disponible en: http://www.ine.gob.mx/descargas/sqre/el_lindano_en_mexico.pdf (diciembre de 2011)
- INEGI, 1993. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, XIII Censo Industrial. Censos Económicos 1993. Tlaxcala. Impreso en México, 1995.
- INFDMGET, 2008. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Tlaxcala.
- Ize LI. 2003. La evaluación de riesgo por sustancias tóxicas. *Gaceta ecológica* 069: 45-56.
- Juárez SL, Gaytán O JC, García NE, Vázquez RGA, Coronel OC. 2009. Evaluación de la genotoxicidad de suelos agrícolas en Tepetitla Tlaxcala en Congreso Nacional de Genética.
- Juarez-Santacruz L, Garcia-Nieto E, Costilla-Salazar R, García-Gallegos E, Coronel-Olivares C, Gómez-Camarillo M, Gaitan-Oyarzuñun J. 2003. Assessment of the Genotoxic potential of sediments contaminated with POOs and agricultural soils using *Vicia faba* micronucleus assay. *Soil and sediment contamination* 22: 288-300.
- Leal-Ascencio MT, Miranda S, Otazo SEM, Prieto-García F y Gordillo AJ. 2009. Metals pollution in El Limón Lagoon, Chiapas, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10(3): 415-421.
- Lee BT y Kim KW. 2009. Lysosomal membrane response of earthworm, *Eisenia fetida*, to arsenic contamination in soils. *Environ Toxicol* 24(4):369-76.
- Mañas TF, Gonzales CUMB, García OH, Weyers AI, Ugnia VL, Larripa HIB y Gorla AN. 2006. La genotoxicidad del herbicida Glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronucleos en ratones tratados. *Theoria* 15(2): 53-60.
- Marcano L. 2006. La lombriz de tierra. Utilidad potencial como bioindicador de contaminación terrestre. En I jornadas de ecotoxicología. Venezuela.

- Martínez-Salinas RI, Díaz-Barriga F, Batres-Esquivel LE y Pérez-Maldonado IN. 2011. Assessment of the levels of DDT and its metabolites in soil and dust samples from Chiapas, México. *Bull Environ Contam Toxicol* 86:33-37.
- Mauricio RM y Bojórquez RG. 2009. Evaluación del efecto genotóxico de aguas tratadas en plantas municipales en ciudad Juárez, Chihuahua mediante análisis de micronúcleos en Vicia faba en Congreso Nacional de Genética.
- Mejía J, Yáñez L, Carrizales L y Díaz-Barriga F. 2002. Evaluación integral de riesgo en sitios contaminados (Una propuesta metodológica). 16 p. (En línea). Disponible en <http://ambiental.uaslp.mx/docs/FDB-EvalRiesgo.pdf> (Última revisión mayo 2012).
- Mejía SJ, Díaz-Barriga MF y Martínez CMA. 2007. Monitoreo ambiental, determinantes de la exposición y efectos de contaminantes críticos en humanos y biota en Coatzacoalcos, Veracruz. INE y UASLP. Convenio: INE/A1-047/2007.
- Méndez PD. 2002. Biodegradación anaerobia de compuestos tóxicos en aguas residuales industriales. Universidad de Santiago de Compostela. pp 230
- Miller-Pérez C, Sánchez-Islas E, Mucio-Ramírez S, Mendoza-Sotelo J, León-Olea M. 2009. Los contaminantes ambientales bifenilos policlorinados (PCB) y sus efectos sobre el Sistema Nervioso y la salud. *Salud Mental* 32 (4):335-346.
- Montalvo FY y Luque LJ. 2010. Guía de evaluación de riesgos ambientales. Ministerio del ambiente-MINAM. Hecho en depósito legal en la biblioteca Nacional del Perú. N° 2010-09144 Perú.
- Montero R, Serrano L, Araujo a, Dávila V, Ponce J, Camacho R, Morales E y Méndez A. 2006. Increased cytogenetic damage in a zone in transition from agricultural to industrial use: comprehensive analysis of the micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 21(5): 335–342.
- Montory M, Chiang G, Fuentes-Rios D, Palma-Fleming H, Barra R. 2008. Bifenilos policlorados (PCBs) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en sedimentos del Mar interior de Chiloé, Resultados del crucero CIMAR 10. *Ciencia y tecnología del Mar* 31: 67-81.
- NORMA OFICIAL MEXICANA: NOM-021-SEMARNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.
- Nordberg G. Metales: Propiedades químicas y toxicas. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. En http://www.mtin.es/es/publica/pub_electronicas/destacadas/enciclo/general/contenido/tomo2/63.pdf
- Nuseti O. 2006. Estrés oxidativo: implicaciones ecotoxicológicas. En I jornadas de ecotoxicología. Venezuela.
- Ongley, E.D. 1997. Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos. Estudio FAO Riego y Drenaje - 55. ISBN 92-5-303875-6.
- Ostling O y Johanson KJ. 1984. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123(1): 291-298.
- Peña CE, Carter DE y Ayala-Fierro F. 2001. Toxicología Ambiental, Evaluación de riesgos y restauración ambiental. Distribuido en Internet vía The Southwest Hazardous Waste Program. 203 p. (En línea). Disponible en <http://toxamb.pharmacy.arizona.edu/toxamb.pdf> (noviembre de 2008).

- Pérez-Maldonado IN, Trejo A, Ruepert C, Jovel RC, Méndez MP, Ferrari M, Saballos-Sobalvarro E, Alexander E, Yáñez-Estrada L, López D, Henao S, Pinto ER y Díaz-Barriga F. 2010. Assessment of DDT levels in selected environmental media and biological samples from México and Central America. *Chemosphere* 78:1244-1249.
- PEL: Probable Effect Levels. Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life.
- Pessala P, Schultz E, Luukkainen S, Herve S, Knuutinen J, Paasivirta J (2004) Periago JF (2003) Evaluación de la exposición laboral a compuestos orgánicos mediante su determinación directa en fluidos biológicos. *Revista de Toxicología* 20(002): 74-70.
- Piola L, Fuchs J, Casabé N, Oneto ML y Kesten E. 2003. Estabilidad de la membrana lisosomal en celomocitos de *E. foetida* expuestas a 2,4,6-trinitolueno (TNT). *Acta Toxicológica Argentina* 11 (2): 76.
- Piola L, Fuchs J, Oneto ML, Basack S, Giménez R, Massaro R, Papa JC, Kesten E y Casabé N. 2009. Biomarkers for the assessment of chlorpyrifos effects on earthworms and on soil functional parameters. *Pesq Agropec Bras Brasília* 44 (8): 874-880.
- Poletta GL. 2011. Monitoreo de daño inducido por palguicidas en *Caiman latirostris* (Yacaré overo) como organismo centinela de los humedales de Argentina. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Arg 249 p.
- Porta M, Kogevinas M, Zumetas E, Sunyer J, Ribas-Fito N, Ruiz L, Jarrod M, Vioque J, Alguacil J, Martin P, Malats N, Ayude D. 2002. Concentrations of persistent toxic compounds in the Spanish population: a puzzle without pieces and the protection of public health. *Gac. Sanit.* 16: 257-266.
- Prieto GEA, Fuchs J, Casabé N, Oneto ML y Kesten E. 2002. Ensayo Cometa en celomocitos de lombrices (*Eisenia fetida*) expuestas a 2,4,6-Trinitrotolueno. *Química viva* 1(1).
- Ramírez RP y Mendoza CA. 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México. SEMARNAT-INE. Méx. 413 p.
- Salazar CL. 2008. Evaluación de la toxicidad de Hidrocarburos poliaromáticos en un sistema acuático y su aplicación en la ponderación de evidencias. Tesis para obtener el grado de Maestro en ciencias. Instituto Politécnico Nacional. 177 p.
- Saavedra GM. 2007. Biodegradación de alperujo utilizando hongos del género *Pleurotus* y anélidos de la especie *Eisenia foetida*. Tesis doctoral, Granada, Universidad de Granada. 227 p.
- Sánchez Ó. 2007. Ecosistemas acuáticos: diversidad, procesos, problemática y conservación. En *Perspectivas sobre conservación de ecosistemas acuáticos en México*. INE-SEMARNAT, 11-37 p.
- Sánchez O, Vega E, Peters E y Monroy-Vilchis O. 2003. Biología de la conservación a escala de ecosistemas: algunas bases para el seguimiento de unidades del paisaje En: *Conservación de ecosistemas templados de montaña en México*. INE-SEMARNAT, US Fish & Wildlife Service y Unidos para la Conservación, A. C., México, 195-236.
- Sanchez-Hernández JC. 2006. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. *Rev Environ Contam Toxicol* 188:85-126.
- Shaposhnikov S, Salenko VB, Brunborg G, Nygren J y Collins A. 2008. Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments?. *Electrophoresis* 29: 3005-3012.
- Silbergeld EK. 2001. Toxicología: Herramientas y enfoques en *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. Organización internacional del trabajo, O.I.T. Tercera edición.

- Sing NP, McCoy MT, Tice RR y Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1): 184-191.
- Sing NP y Stephens RE. 1997. Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanism and DNA electrostretching. *Mutat Res* 383: 167-175.
- Tolcachier AJ. 200. Compuestos orgánicos persistentes. Libro Virtual IntraMed de medicina ambiental. Editorial Roemmers. En http://www.intramed.net/sitios/libro_virtual4/.
- Tovalín H, Whitehead L, Blanco S. 2007a. Personal exposure to PM2.5 and element composition: a comparison between outdoor and indoor workers from two Mexican cities. *Atmos Environ*. 41(35):7401-7413.
- Uribe HR. 2008. Ensayo de citotoxicidad aguda con celomocitos de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* en Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. 225-231.
- Vázquez VJD. 2007. La migración internacional como estrategia de reproducción familiar en la región oriente de Tlaxcala. Tesis doctoral. 93-104.
- Velasco AN. 2004. Efecto de pretratamientos fisicoquímicos en la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en un suelo intemperizado, por composteo. Tesis para obtener el grado de especialista en biotecnología, UAMI.
- Vindas R, Ortiz F, Ramírez V y Cuenca P. 2004. Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. *Rev Biol Trop* 52 (3): 601-609.
- Waliszewski SM e Infanzón RM. 2003. Diferencias en concentración de plaguicidas organoclorados persistentes en suelo, paja y granos de trigo. *Rev Int Contam Ambient* 19(1): 5-11.
- Wang GL, Ma LM, Sun JH y Zhang G. 2010. Occurrence and distribution of organochlorine pesticides (DDT and HCH) in sediments from the middle and lower reaches of the Yellow River, China. *Environ Monit Assess* 168: 511-521.
- Xiao RY, Wang Z, Wang CX, Yu G y Zhu YG. 2006. Genotoxic risk identification of soil contamination at a major industrialized city in northeast China by a combination of in vitro and in vivo bioassays. *Environ Sci Technol* 40(19): 6170-6175.
- Yáñez L, Ortiz-Pérez D, Batres LE, Borja-Aburto VH y Díaz-Barriga F. 2002. Levels of dichlorodiphenyltrichloroethane and deltamethrin in humans and environmental samples in malarious areas of México. *Environ Res* 88:174-181.
- Zalacain M, Sierrasesúmaga L y Patiño A. 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An. Sist. Sanit. Navar* 28(2): 227-236.
- Zhong Y, Feng SL, Luo Y, Zhang GD y Kong ZM. 2001. Evaluating the genotoxicity of surface water of Yangzhong City using the *Vicia faba* micronucleous test and the comet assay. *Bull Environ Contam Toxicol* 67: 217-224.
- Zuñiga VLA. 2009. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana. Tesis, Universidad autónoma de Barcelona.

11. GLOSARIO DE TÉRMINOS

Ecotoxicología: Ciencia que se encarga de estudiar los efectos de las sustancias químicas sobre la estructura y función de los ecosistemas. De hecho valorar y predecir efectos sobre estructuras altamente complejas es una tarea difícil de desarrollar y es por ello, que se han diseñado modelos de valoración de riesgos que nos permiten predecir situaciones adversas sobre el medio ambiente producto de la liberación de sustancias químicas.

Xenobiotico: Compuesto o sustancia tóxica extraña al organismo.

Riesgo ambiental: Se define como la probabilidad de ocurrencia que un peligro afecte directa o indirectamente al ambiente y a su biodiversidad, en un lugar y tiempo determinado, el cual puede ser de origen natural o antropogénico.

Escenario de exposición: Es el área física que comprende el área geográfica en riesgo.

Ruta de exposición: Trayectoria que sigue un contaminante desde la fuente de emisión hasta el cuerpo receptor identificado como potencialmente expuesto.

Estimación de la exposición: Es el estudio de la ruta de exposición, tiene por objeto llegar a determinar la cantidad de sustancia tóxica está en contacto con un organismo durante el período de exposición.

Potencial: Proceso mediante el cual se determina un peligro o amenaza que comprometa la calidad del agua, aire o suelo el cual pone en riesgo a la salud del ser humano y a la biodiversidad como consecuencia de la exposición a fuentes contaminantes del ambiente en un lugar y tiempo determinado como consecuencia de actividades de origen natural o antropogénico.

Evaluación del riesgo ambiental: Es el proceso mediante el cual se determina si existe una amenaza potencial que comprometa la calidad del agua, aire o suelo, poniendo en peligro la salud del ser humano como consecuencia de la exposición a todos los productos tóxicos presentes en un sitio, incluyendo aquellos compuestos tóxicos presentes que son producto de actividades industriales ajenas al sitio o cualquier otra fuente de contaminación, y define un rango o magnitud para el riesgo.