

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE



ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DEL AGUA
DE LA RESERVA ECOLÓGICA LAS CUEVAS
UTILIZANDO A *CYPRINUS CARPIO* COMO INDICADOR
DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

PRESENTA

NICOLÁS EMMANUEL HERNÁNDEZ PÉREZ

REALIZADO BAJO LA DIRECCIÓN DE
DRA. ELVIA ORTIZ ORTIZ
DRA. LIBERTAD JUÁREZ SANTACRUZ

TUTORAS
DRA. ARELY ANAYA HERNÁNDEZ
DRA. CLAUDIA ROMO GÓMEZ



IXTAQUIXTLA, TLAX. JULIO DE 2023



C. NICOLÁS EMMANUEL HERNÁNDEZ PÉREZ

P R E S E N T E

En cumplimiento al artículo 52 fracción "d" del Reglamento General de Evaluación Académica, el comité de evaluación de examen de grado ha revisado el trabajo de investigación titulado: **"Estudio de la toxicidad del agua de la reserva ecológica Las Cuevas utilizando a *Cyprinus carpio* como indicador de contaminación ambiental"**, realizado bajo la dirección de **Dra. Libertad Juárez Santacruz y Dra. Elvia Ortiz Ortiz**. No habiendo encontrado objeción alguna, se autoriza su impresión:

Dra. Elvia Ortiz Ortiz

Dra. Libertad Juárez Santacruz

Dra. Claudia Romo Gómez

Dra. Arely Anaya Hernández

Dr. José Luis Martínez y Pérez

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"

Ixtacuixtla, Tlax., 27 de julio de 2023.


Dra. Edelmira García Nieto
COORDINADORA GENERAL DEL CIGyA Y POSGRADO

c.c.p. Expediente



Este trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Toxicología y Química Ambiental del Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Beca No.775505 otorgada por CONACyT

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Toxicología y Química Ambiental del Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por permitirme desarrollar este trabajo.

A la Dra. Claudia Romo Gómez laboratorio de Ciencias Ambientales AAQ-UAEH y a la M. en C. María Lilia Calva Rodríguez Centro Nacional de Prevención de Desastres (CENAPRED) Por el apoyo brindado para el análisis de EPTs.

A mi comité tutorial, la Dra. Arely, Dra. Elvia y el Dra. Claudia por compartir sus experiencias profesionales sus sabas palabras y conocimientos rigurosos, en especial a la Dra. Liberta con quien estaré siempre en deuda por la confianza, la dirección, las ideas, las llamadas de atención y el apoyo que me ha brindado para la culminación de este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento la Dra. Edelmira por su orientación, el material facilitado y las sugerencias recibidas por que un trabajo de investigación también es fruto del apoyo que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no se tendrían las energías necesarias para crecer moral, personal y profesionalmente.

Mi familia

A Circe y a mi hija, por su paciencia, comprensión y solidaridad, por el tiempo que me han concedido y el tiempo robado a la historia familiar.

A mi madre Juana Chablé por el apoyo que me ha brindado en todos estos años que me motiva a seguir proponiéndome metas y superarme continuamente.

A Doña Gloria que siempre nos ha brindado su apoyo en momento cruciales para alcanzar muchos de los objetivos que nos hemos propuesto Circe y yo.

Resulta importante reconocer el cariño, apoyo, consejos y tiempo de mi tía Carolina que sin ella no hubiera podido lograr esta meta, le agradezco y hago presente este gran afecto que le tengo.

Gracias a dios por permitirme disfrutar de esta experiencia y colocar en mi camino a esa persona que con su característica frase *“pudo haber quedado mejor”* siempre busca la forma de apoyarme y es responsable de que cumpla con excelencia en el desarrollo de este trabajo.

A todos muchas gracias.

INDICE

ÍNDICE DE TABLAS	
INDICE DE FIGURAS	
RESUMEN	1
ABSTRAC	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Marco Teórico.....	3
1.1.1 Ecosistemas Acuáticos.....	3
1.1.2 La Problemática Ambiental de los Ecosistemas Dulceacuícolas.....	5
1.1.3 Calidad del Agua	7
1.1.3.1 Características Físicas y Químicas	8
1.1.3.2 Sedimentos	11
1.1.4 Elementos potencialmente tóxicos (EPT).....	12
1.1.5 Evaluación integral de riesgo	16
1.1.6 Espacios naturales protegidos	26
1.1.7 Área de estudio.	28
1.2 Antecedentes	31
1.3 Preguntas de investigación	34
1.4 Hipótesis.....	35
1.5 Justificación.....	36
1.6 Objetivos	37
1.6.1 Objetivo General	37
1.6.2 Objetivos Específicos	37
2. METODOLOGIA.....	38
2.1 Puntos de muestreo	38
2.2. Muestreo ambiental.....	38
2.3. Análisis fisicoquímicos de agua.....	39
2.3.1. In situ.....	39
2.3.2. Laboratorio	39
2.4 Análisis fisicoquímico de Sedimento	43
2.4.1. Determinación de pH.....	43
2.4.2. Determinación de materia orgánica (MO).....	43
2.5. Cuantificación de EPT en agua y sedimento.....	46
2.5.1. Digestión	46
2.5.2. Cuantificación de EPTs por EAA.....	46

2.6. Determinación del Igeo, FE y CP de EPTs en sedimento	46
2.6.1. Índice de geoacumulación (I-geo)	46
2.6.2. Factor de enriquecimiento (FE) de EPTs en sedimentos	47
2.6.3. Cociente de peligro	48
2.7. Muestreo biológico in situ	48
2.8. Exposición in vivo (laboratorio).....	50
2.8.1. Aclimatación	50
2.8.2. Exposición.....	51
2.9. Evaluación de la genotoxicidad en <i>Cyprinus carpio</i>	52
2.9.1. Medidas morfométricas	52
2.9.2. Obtención de muestras biológicas	53
2.10. Evaluación de genotoxicidad por ensayo de micronúcleos (MN)	54
2.10.1. Preparación y tinción de laminillas	54
2.10.2. Análisis al microscopio	55
2.11. Evaluación de la genotoxicidad por ensayo cometa.....	55
2.11.1. Preparación de laminillas	55
2.11.2. Desenrollamiento y electroforesis	56
2.11.3. Análisis al microscopio	56
2.12. Análisis Estadístico	57
3. RESULTADOS	58
3.1. Visita e Inspección del Sitio de Estudio.....	58
3.2. Puntos de Muestreo	59
3.3. Análisis fisicoquímicos del agua.....	65
3.4. Análisis fisicoquímico de sedimento.....	69
3.4.1 Cuantificación de elementos potencialmente tóxicos (EPTs) y como cociente de peligro (CP) en muestras de la RE la Cueva.....	70
3.4.2. EPTs y CP en Agua	70
3.5. Parámetros morfométricos de <i>C. carpio</i> in situ e in vivo	73
3.5. Cuantificación de EPTs en tejido muscular de <i>C. carpio</i> capturadas en la RE la Cueva.....	74
3.6.Evaluación genotóxica del agua de la RE a través del ensayo de MN en <i>C. Carpio</i>	75
3.7. Evaluación genotóxica del agua de la RE a través del ensayo cometa en <i>C. Carpio</i>	83

4. DISCUSIÓN.....	84
5. CONCLUSIONES.....	90
6. REFERENCIAS	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua utilizadas en el estudio	68
Tabla 2	Valores de pH, materia orgánica y textura de sedimentos superficiales de la reserva ecológica las Cuevas	69
Tabla 3	Concentración de elementos potencialmente tóxicos ($\mu\text{g/ml}$) y cociente de peligro en agua de los diferentes puntos de la reserva ecológica las Cuevas	71
Tabla 4	Concentración de EPTs ($\mu\text{g/g}$) y CP en sedimento superficial de los sitios de la Reserva ecológica las Cuevas	72
Tabla 5	Factor de enriquecimiento e índice de geoacumulación en muestras de sedimento de la RE La Cueva	72
Tabla 6	Medidas morfométricas y factor de condición de carpas (<i>C. carpio</i>) después de la exposición <i>in situ</i> e <i>in vivo</i>	73
Tabla 7	Promedio de las concentraciones de EPTs (mg/kg) en tejido muscular de <i>C. carpio</i> después de la exposición <i>in situ</i>	74
Tabla 8	Clasificación de moléculas de DNA de eritrocitos de <i>C. carpio</i> después de la exposición <i>in situ</i> e <i>in vivo</i> a muestras de agua de diferentes puntos de la RE Las Cuevas	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Etapas de la metodología de evaluación integral de riesgo aplicadas a este estudio. (Modificada de Ilizaliturri et al., 2009)	16
Figura 2	Imagen de <i>Cyprinus Carpio</i>	20
Figura 3	Formación de MN por pérdida de un cromosoma entero o fragmentos cromosómicos durante la división celular (Tomado de Tibusay-Matheus et al., 2014).	25
Figura 4	Ubicación del ANP La Cueva, Apetatitlán de Antonio Carvajal, Tlax.	29
Figura 5	Captura de peces (<i>Cyprinus carpio</i>) para la evaluación de exposición y efecto in situ, en el punto 2 de la zona de estudio	49
Figura 6	Proceso de desintoxicación a través del cambio paulatino-progresiva del agua del sitio por agua de grifo.	49
Figura 7	Procesamiento de aclimatación de los peces en acuarios de 40 l. previo a su exposición in vivo a agua de los diferentes puntos de muestreo de la RE La Cueva. A) Captura de organismos, B) Separación en grupos y C) Colocados en peceras.	51
Figura 8	Exposición de peces (<i>C. carpio</i>) a muestras de agua de la RE La Cueva.	52
Figura 9	Esquema de medidas morfométricas tomadas de <i>Cyprinus carpio</i>	53
Figura 10	Muestreo de tejido muscular de <i>C. carpio</i> después de la exposición in situ e in vivo a muestras de agua de la RE La Cueva. (Tomado de González, 2019)	54
Figura 11	Técnica para el extendido de muestra sanguínea (frotis).	54
Figura 12	Micronúcleo (señalado con flecha) en eritrocitos de sangre periférica de <i>C. carpio</i> . (Cámara web salandens HD 1080P).	55
Figura 13	Molécula de DNA con las diferentes clases de daño. (Fuente: Propia).	56
Figura 14	Delimitación de las zonas con actividades antrópicas aledañas a la RE La Cueva	59
Figura 15	Localización de puntos de muestreo georreferenciados en la RE la Cueva	60
Figura 16	Sitio de muestreo P1, A y C) lavaderos comunitarios, B) confluencia de pequeños arroyos y D) nacimiento de 4 manantiales. Fuente propia: Cámara digital de resolución estándar DCX x2.	61
Figura 17	Sitio de muestreo P2, A y B) humedal artificial, especies encontradas C) carpa común adulta y D) chipe arroyero (especie migratoria).	62

Figura 18	Punto P3 ubicado en los límites de la reserva ecológica la Cueva	63
Figura 19	Punto de muestreo P4, ubicado a un costado de la zona de prueba de agroquímicos	64
Figura 20	Imágenes representativas de los puntos P5 y P6 ambos en el río Zahuapan	65
Figura 21	Promedio de la frecuencia de MN en eritrocitos de <i>C. carpio</i> capturadas <i>in situ</i> en el P2 de la RE Las Cuevas	75
Figura 22	Valor medio de la frecuencia de células globuladas (GB) y con muesca (MU) en eritrocitos de <i>C. carpio</i> después de la exposición <i>in situ</i> en el agua de la RE Las Cuevas.	76
Figura 23	Valor medio de la frecuencia de células en apoptosis y necrosis en eritrocitos de <i>C. carpio</i> después de la exposición <i>in situ</i> al agua de la RE Las Cuevas.	77
Figura 24	Media de la frecuencia de MN en eritrocitos de <i>C. carpio</i> después de la exposición <i>in vivo</i> al agua de diferentes puntos de la RE Las Cuevas.	78
Figura 25	Promedio de la frecuencia de células globuladas (GB) y con muesca (MU) en eritrocitos de <i>Cyprinus carpio</i> después de la exposición <i>in vivo</i> al agua de los diferentes puntos RE Las cuevas.	79
Figura 26	Media de la frecuencia de células en apoptosis y necrosis de eritrocitos de <i>C. carpio</i> después de la exposición <i>in vivo</i> al agua de los diferentes puntos RE Las cuevas.	79
Figura 27	Comparación de la frecuencia de MN obtenida en eritrocitos de <i>C. carpio</i> después de los experimentos <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> del punto 2 de la RE La Cuevas	80
Figura 28	Comparación de la frecuencia de anormalidades nucleares: a) Células lobuladas, b) Células con muescas; así como efectos citotóxicos: c) Células en apoptosis y d) Células en necrosis; en eritrocitos de <i>C. carpio</i> después de los experimentos <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> del punto 2 de la RE La Cuevas	81

RESUMEN

El presente estudio evaluó el impacto genotóxico del agua y sedimento de la Reserva Ecológica Las Cuevas ubicada en el municipio de Apetatitlán Antonio de Carvajal empleando a la carpa común (*Cyprinus Carpio*) para la valoración del riesgo ambiental derivado de las actividades antrópicas que se desarrollan alrededor de esta RE. Con el fin de evaluar las posibles diferencias en las respuestas por estrés y condiciones ambientales, se compararon los diseños experimentales *in situ* (tomando organismos que habitan en la zona) e *in vivo* (condiciones controladas exponiendo a organismos a matrices de la zona) realizando la exposición de estos en un periodo de dos semanas. El agua de la RE Las Cuevas produjo una frecuencia de micronúcleos (8.06 ± 2.4 MN/1000) dos veces mayor que el valor obtenido para los organismos que se sometieron al proceso de desintoxicación (3.7 ± 2.5 MN/1000 CT), además se analizaron otro tipo de efectos tal es el caso de las anormalidades nucleares (AN), de esta manera se obtuvo el promedio de la frecuencia de células globuladas (7.1 ± 3.75 GB/1000 CT) y células con muescas (5.8 ± 3.22 MU/1000 CT), los resultados fueron estadísticamente diferentes al control (2.4 ± 1.32 GB/1000 CT y 1.8 ± 1.55 MU/1000 CT). Referente al ensayo comenta Las moléculas de ADN con los diferentes niveles de daño se incrementaron significativamente con respecto al control negativo a excepción del punto P1(6.67 ± 1.53) en donde se aprecian valores similares al CN (6.33 ± 0.58), la case 1 y 2 las que presentaron mayor porcentaje, destacando que en el punto RC5 se encuentra el nivel más alto de daño inclusive superando al nivel CP con valores de 60.00 ± 22.52 y 33.51 ± 5.69 respectivamente. Los resultados de este estudio confirman la utilidad de *Cyprinus carpio* como bioindicador de contaminación ambiental.

ABSTRAC

The present study evaluated the genotoxic impact of the water and sediment of the Las Cuevas Ecological Reserve located in the municipality of Apetatitlán Antonio de Carvajal using the common carp (*Cyprinus Carpio*) for the assessment of the environmental risk derived from the anthropic activities that take place around it. of this RE. In order to evaluate possible differences in responses due to stress and environmental conditions, the experimental designs were compared in situ (taking organisms that live in the area) and in vivo (controlled conditions exposing organisms to matrices in the area) by performing the exposure of these in a period of two weeks. The water from the Las Cuevas RE produced a frequency of micronuclei (8.06 ± 2.4 MN/1000) twice higher than the value obtained for the organisms that underwent the detoxification process (3.7 ± 2.5 MN/1000 CT), and were also analyzed Another type of effect is the case of nuclear abnormalities (NA). In this way, the average frequency of globulated cells (7.1 ± 3.75 GB/1000 CT) and cells with notches (5.8 ± 3.22 MU/1000 CT) was obtained.), the results were statistically different from the control (2.4 ± 1.32 GB/1000 CT and 1.8 ± 1.55 MU/1000 CT). Regarding the test, he comments that the DNA molecules with the different levels of damage increased significantly with respect to the negative control, except for point P1 (6.67 ± 1.53) where values similar to CN (6.33 ± 0.58), case 1 and 2 those that presented the highest percentage, highlighting that at point RC5 the highest level of damage is found, even exceeding the CP level with values of 60.00 ± 22.52 and 33.51 ± 5.69 respectively. The results of this study confirm the usefulness of *Cyprinus carpio* as a bioindicator of environmental pollution.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Marco Teórico

I.1.1 Ecosistemas Acuáticos

Los cuerpos de agua continentales se forman por la interacción de la orografía y la entrada del agua proveniente de la lluvia, del derretimiento de la nieve o del hielo de los glaciares, en ellos se desarrolla una amplia gama de ecosistemas que van desde las charcas y ríos intermitentes, hasta los manantiales, ríos permanentes, lagos, lagunas y esteros, sus características ecológicas varían según las condiciones particulares de las cuencas, así como del clima, suelo, tipo de vegetación y biodiversidad. Los ecosistemas acuáticos continentales pueden dividirse en sistemas lóticos y lenticos, los primeros corresponden a aguas superficiales y se caracterizan por estar en movimiento como ríos y arroyos y los lenticos son almacenamientos de agua, ya sea naturales o artificiales como lagos, embalses y presas (Arriaga *et al.*, 2018).

Los ecosistemas acuáticos se consideran sumamente sensibles a las alteraciones que se suscitan en los alrededores como la reducción de la cobertura vegetal misma que cumple un papel fundamental en la retención de contaminantes tóxicos, esta interacción que surge entre el medio terrestre y acuático culmina con la constante exposición a la contaminación de origen antrópico (industrial, urbano, agrícola, etc.) un ejemplo de este tipo de aportaciones son las descargas clandestinas de drenaje, desechos y desperdicios sólidos entre otros. La contaminación que enfrentan los cuerpos de agua en la región puede provenir de los efluentes de agua residual o industrial, emisiones atmosféricas, actividades agrícolas y ganadería (Romero *et al.*, 2010).

Los medios acuáticos son uno de los sistemas más importantes para la vida ya que en ellos encontramos el vital líquido sin embargo su disponibilidad está limitada en cantidad, calidad y distribución en la superficie terrestre (SEMARNAT-CONAGUA 2016) aunado a esta perspectiva la demanda del mismo se considera en aumento debido a la constante

expansión demográfica urbanizada sobrepasando la capacidad de abastecimiento (CONAGUA 2017), características tan básicas como lo son la temperatura, la humedad relativa, la altitud, el pH, la percepción de una cuenca hidrológica e inclusive el mal manejo de los desechos de las comunidades aledañas han favorecido el deterioro de estos, los procesos biogeoquímicos que se llevan a cabo en los medios acuáticos resultan muy importantes para el crecimiento adecuado de los demás ecosistemas que los rodean.

El recurso hídrico ha sufrido importantes alteraciones, debido a múltiples factores contribuyendo a la contaminación física, química y biológica del agua. Esto ha generado la alteración del paisaje, incremento de sedimentos en los sistemas hidrológicos, pérdida de resiliencia de cuencas hidrográficas, así como pérdida de la cobertura vegetal que se ve directamente asociada a cuerpos de agua, viéndose alteradas las propiedades naturales del agua (Rondón, 2015). Las características físicas y químicas de un ecosistema acuático pueden estar afectadas por diversos fenómenos naturales, pero también se ven perturbados directa e indirectamente por las diferentes actividades antrópicas de la región en la que se encuentren por tanto es importante considerar como un perturbador a cualquier contaminante que por sus características y procedencia llegue a exceder la capacidad de resiliencia, esta función de regeneración la poseen todos los cuerpos de agua como ríos, humedales, lagos y lagunas estos cuerpos dependen en su totalidad de la recarga de los mantos acuíferos que se da gracias a la relación que existe entre las estaciones del año y la pluviosidad de cada zona de la república mexicana cabe destacar que la importancia es alta en zonas caracterizadas como semiáridas, como las ubicadas en estado de Tlaxcala, donde la mayor recarga suele suceder tras las lluvias intensas de los meses de que comprenden de junio a septiembre donde la media de precipitación estatal figura entre los 700 mm a 740mm anuales de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI 2015).

La problemática con respecto a la calidad de los ríos ha aumentado el interés general, a fin de determinar, los componentes que influyen en la estructura, composición y dinámica actual de las cuencas hidrográficas (Ocampo *et al.*, 2013). Las vulnerabilidades de un ambiente acuático son muy variadas puesto que involucran prácticamente el lugar donde se encuentren ubicados, sin embargo, hay algunos que son generales y que con el paso del tiempo se han ligado como el incremento de la urbanización de zonas que antes se catalogaban vírgenes:

- a) Ubicación de ecosistema acuático.
- b) Concentraciones de la carga vegetal.
- c) Concentraciones de las cargas y recargas del ecosistema.
- d) Procedencia de los caudales.
- e) Recorrido del caudal.

Como respuesta a esta problemática, ha surgido la necesidad de realizar monitoreos de los recursos bióticos con el propósito de detectar cambios significativos en la flora y en la fauna (Margalef 1974), naturalmente la presencia de contaminantes no solo está ligada a la parte visual sino también a la parte de condiciones del agua, todo esto partiendo de las evaluaciones integrales de los ecosistemas acuáticos que ayudan a formular mecanismos de interacción que favorecen el conocimiento que se tiene de entornos específicos desde un contexto aterrizado en la ecología y toxicología.

1.1.2 La Problemática Ambiental de los Ecosistemas Dulceacuícolas

Las presiones que se ejercen actualmente sobre los diferentes ecosistemas dulceacuícolas y la biodiversidad que poseen se ven evidenciadas desde diferentes frentes: el incremento de las actividades productivas como la agricultura las descargas de diferente efluentes tanto de origen industrial como doméstico entre otras, se encuentran alterando sus condiciones físicas, químicas y biológicas, provocando que la calidad de éstos se deterioren

disminuyendo los beneficios que brindan a la biota (Nichols, *et al.*, 1986 Perissinotto *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011).

Es importante hacer mención de que todos estos efectos pueden reflejarse dentro de las áreas que ocupan los ecosistemas acuáticos o bien sus cuencas, de ahí que los diferentes escurrimientos superficiales generados por las precipitaciones hagan que las áreas agrícolas carguen excesivamente de nutrimentos a los sistemas acuáticos generando una contaminación ubicada en las partes altas y estos por arrastre puedan alcanzar y contaminar por medio de afluentes de menor caudal a los grandes ríos o lagos, los compuestos potencialmente tóxicos, de origen natural y antrópico dentro de los cuales se encuentran metales pesados, hidrocarburos, contaminantes orgánicos persistentes y nutrientes afectan a los ecosistemas naturales generando diversos efectos tanto biológicos como químicos (Anzecc y Armacanz 2000, Muniz *et al.* 2006, Smith *et al.*, 2006; Brugnoli *et al.*, 2007, Muniz *et al.*, 2011).

Las principales amenazas para los ecosistemas acuáticos continentales son la reducción o degradación del hábitat, la introducción de especies invasoras, la sobreexplotación de los recursos pesqueros y el cambio climático (UNESCO-WWAP, 2007). Sin embargo, existen otras como la construcción de presas y embalses para la generación de energía eléctrica, la sobreexplotación del agua y su contaminación por descargas agrícolas, municipales e industriales, en general los ecosistemas acuáticos son alterados continuamente además la sinergia de contaminantes provenientes de las múltiples fuentes de contaminación pueden provocar asociaciones deletéreas, como la adsorción de diferentes metales a partículas de sedimento que frente a cambios en ciertos parámetros físico-químicos rápidamente se vuelven biodisponibles (Newman y Clements, 2008).

1.1.3 Calidad del Agua

La calidad de agua esta íntimamente ligada con la interrelación socio cultural de un sitio determinado, la subjetividad que posee este término permite que su aplicación este restringido a significado de que cada uno posee del agua hay que mencionar que este es uno de los recursos más importante para la sustentación de la vida, favoreciendo el crecimiento poblacional de un entorno determinado, dictaminada por los acuíferos, ríos, lagos y lagunas fungen como reservorios superficiales de donde se extrae este vital líquido para el afloramiento de la biota.

Desde un punto de referencia cualitativo se puede decir que la calidad del agua se define por el uso final deseado, es decir si su uso es para recreación, pesca, consumo y/o para hábitat de organismos acuáticos necesita presentar ciertos grados de pureza, mientras que el agua que se emplea para la producción de un recurso energético como son los centros hidroeléctricos, las normas de calidad no tienden a tener una importancia relevante. Por esta razón, la definición de calidad del agua llega a ser muy amplia y en ocasiones ambigua, sin embargo, hace énfasis a las características físicas, químicas e inclusive biológicas necesarias para los usos deseados. Mucho de este vital líquido después de ser utilizado, suele regresar a los sistemas hidrológicos superficiales y subterráneos, si no es tratada, puede llegar a tener repercusiones graves al medio ambiente (Mendoza, 2007; Rivera *et al.*, 2009; Cutimbo, 2012). Las variables físicas y químicas suelen dar una idea específica de la calidad en la que se encuentran ciertos cuerpos de agua (Arango *et al.*, 2008).

El índice de calidad del agua (ICA) permite desde ciertos puntos referenciales hacer comparaciones de los niveles de contaminación que existen en diferentes área, en base a lo anterior se puede entender que desde el criterio de evaluación de la afectación por presencia de centros urbanos que por ciertas características específicas producen una cantidad de desechos (líquidos, acuosos y semilíquidos) que entran en rubros de calidades

relativas que agrupadas permiten mediante comparaciones integrales ser cotejadas e identificar los niveles de contaminación que presentan ciertos cuerpos de agua, entre estos parámetros destacan la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅), la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y los Sólidos Suspendidos Totales (SST).

Cada uno de estos parámetros aporta información significativa que permite tener formular un sistema legible y comparable, la DBO₅ y la DQO se encargan de la determinación y cuantificación de la materia orgánica presente en los cuerpos de agua determinados así también la DQO permite determinar si en el efluente existen sustancias que provienen de descargas no municipales, en específico la primera de ellas determina la cantidad de material orgánico que es biodegradable y la segunda de estas se encarga de cuantificar la cantidad total de materia orgánica. Por otra parte, los SST pueden determinar la capacidad de soporte de vida acuática que posee un cuerpo de agua, es decir si el nivel es elevado la capacidad albergar vida se verá severamente afectada. Estos tres factores proporcionan una evaluación pertinente que va desde un resultado con una condición nula de actividad antrópica hasta una altamente influenciada por las actividades antropocénicas de la región (SEMARNAT, 2019).

I.1.3.1 Características Físicas y Químicas

pH. Se refiere a una medida de la tendencia que puede seguir el agua con respecto a su acidez o alcalinidad. Cuando el pH es menor de 7.0 indica una tendencia hacia un agua ácida, y cuando es mayor muestra una tendencia alcalina, la mayoría de los cuerpos de agua naturales tienden a un pH entre 4 y 9, aunque se han tenido registros de algunos ligeramente básicos debido a la presencia de carbonatos y bicarbonatos. El pH bajo en agua permite que los elementos tóxicos y sus compuestos tengan una mayor movilidad y les permita estar más disponibles para los diferentes organismos que ahí habitan (Yan *et al.*, 2007; Minaverry, 2014). Esto último facilita que los organismos empleados como

bioindicadores puedan detectar perturbaciones en los entornos que son actualmente estudiados.

Turbidez. Indica el gradiente del nivel de transmitancia de la luz dentro de la matriz agua, es una medida de su calidad en relación a la cantidad de materia suspendida coloidal y residual, varía dependiendo de la fuente de luz, el método de medición, las propiedades de absorción de luz por el material suspendido así como por la concentración que existe de materiales dentro del agua.

La turbiedad ha sido una característica aplicada como criterio para la evaluación de calidad del agua, tanto en pozos que funcionan como abastecimiento al igual que en los procesos de potabilización y sistemas hidrológicos, ya que es una de las mediciones más rápidas, económicas y que permiten una fácil interpretación de los datos obtenidos. Kawamura (2000).

Conductividad. Es la medida de la capacidad del agua para transmitir la corriente eléctrica, se mide con un conductímetro, mediante la resistencia del paso de una corriente eléctrica entre dos electrodos (Ormarza 2011).

El agua pura no permite la conductividad, pero una vez que se ve alterada su constitución química añadiendo sales minerales puede convertirse en un excelente conductor y esto dependerá de la cantidad que exista en disolución dentro de la misma, este parámetro se usa para determinar la salinidad del agua en términos de la capacidad de conductividad eléctrica y se expresa en unidades de Siemens/metro ($S \cdot m^{-1}$) (García, 2012; Ros, 2011).

Alcalinidad. Es la característica que determina el potencial del agua para neutralizar ácidos, es definido para unos rangos específicos de pH. La medición de alcalinidad total indica la capacidad de neutralización a un pH de 4.5 y la alcalinidad a la fenolftaleína hasta un pH de 8.3. En la mayoría de los cuerpos de agua naturales la alcalinidad está producida en su totalidad por la presencia de iones carbonato y bicarbonato, aunque, en ocasiones,

otro tipo de ácidos débiles como el bórico, fosfórico, silícico y ácidos orgánicos pueden contribuir de forma importante a la presencia de esta propiedad (Castillo et al., 2009).

La alcalinidad se determina a través de una titulación la cual posee una solución valorada de un alcalino o un ácido dependiendo el caso considerando la concentración de los iones hidroxilos (OH^-), carbonato (CO_3^{2-}) y bicarbonato (HCO_3^-) presentes en la muestra de titulación. Cuando el nivel de alcalinidad es menor de 10 ppm se recomienda para un uso doméstico, y cuando los valores exceden este nivel se recomienda aplicar algunos métodos como el de descarbonatación mediante el uso de cal; tratamiento con ácido o desmineralización por intercambio iónico (Pinos et al., 2011).

Dureza. Se conoce como la suma total de carbonatos de calcio y magnesio que se encuentran en el agua, cuando la concentración de estos compuestos oscila entre los 150 y 300 mg/L se consideran aguas duras; cuando el valor está por encima de los 300 mg/L se denominan muy duras (Rodas, 2010). La dureza es causada por la presencia de cationes y es discutida en términos de la presencia o ausencia de carbonatos. La dureza de carbonato y bicarbonato se puede eliminar mediante la precipitación en presencia de calor. Por otra parte, la dureza de no-carbonatos es causada principalmente por la asociación que se da con los cationes de sulfatos, cloruros y nitratos. Es importante destacar que esta dureza se conoce como permanente debido a que no es posible retirarla por medio de calor (Baccaro et al., 2006; Molinero, 2019)

Cloruros. De acuerdo con el departamento de recursos naturales de Iowa, 2009. El cloro (Cl_2) es ampliamente utilizado como un efectivo desinfectante, sin embargo, cuando se combina con un metal, como el sodio (Na), se convierte en una molécula esencial para la vida, pues se ha encontrado que se requieren pequeñas cantidades de cloruros para que se realicen algunas funciones celulares. El cloro existe como tal en forma de cloruros (Cl^-) en todos los cuerpos de agua superficiales y subterráneos, sin embargo cuando este alcanza altas concentraciones de vuelve tóxico para diferentes organismos. Todos los

cloruros comunes son altamente solubles en agua y aumentan el contenido total de sales que se pueden encontrar en los suelos (Palacio *et al.*, 2011), tienen la capacidad de proveer al agua un sabor ligeramente salado dependiendo de su concentración, además puede influir en su composición química. La presencia en exceso del ion cloruro Cl⁻ el agua puede llegar a afectar el crecimiento vegetal, también se ha encontrado que puede dañar estructuras metálicas y conducciones (Panno *et al.*, 2006).

I.1.3.2 Sedimentos

Los sedimentos se forman a partir de partículas procedentes de las rocas o suelos aledaños a corrientes de agua que por acción de escorrentía o vientos son acarreados depositándose en el lecho de los cuerpos de agua dando origen a la formación de capas sedimentarias, el depósito continuo de estas capas logra la modificación estructural de los mismos dando como resultado características específicas de los propios cauces (Siancas-Columbus, 2018) debido a la procedencia de las partículas las clasificaciones más aceptadas para estos pueden ser de origen natural y antrópico.

Los sedimentos de origen natural se originan a partir de la erosión es el principal causante de la acumulación de capas sedimentarias en los lechos de los cuerpos de agua de una región establecida, así también se debe tener en cuenta que los ríos pueden ser juveniles, maduros y viejos. A cada una de estas tres etapas en la vida de un río permiten desarrollar cambios graduales en sus diferentes perfiles característicos (longitud, profundidad, trazo y caudal), este tipo de características permiten a los cuerpos de agua acarrear materiales de diversos tamaños, depositándolos, en forma gradual a lo largo de su perfil longitudinal.

Por su parte los sedimentos de origen antrópico se pueden formar por: a) desechos urbanos e industriales, es decir por aquellos materiales arrastrados por drenajes y que por sus características de uso son arrojados directa o indirectamente a los cuerpos de agua

como ríos y lagos; b) por destrucción de la vegetación y obras de ingeniería, la destrucción de la cobertura vegetal de las zonas aledañas a los cuerpos de agua para el desarrollo urbano o industrial es un detonante de cambios abruptos en la constitución física y química de un sedimento ya que grandes volúmenes de materiales son removidos provocando que queden más sueltos que en su estado natural dejando expuestos materiales que por acciones naturales de las matrices ambientales son transportados generando diferentes cambios a su alrededor y c) por explotación de minas y canteras: todas las actividades de explotación de recursos minerales tienen como finalidad romper, fracturar y deformar las rocas, suelos produciendo grandes cantidades de partículas que se depositan continuamente en las capas sedimentarias de los cuerpos de agua.

Desde el punto de referencia de la resistencia que las diferentes partículas ponen al ser arrastradas y de su comportamiento al ser transportados por una corriente de agua se pueden distinguir otra clasificación como cohesivos (arcillas y legamos) no cohesivos (arenas y gravas). (García y Maza,1998).

1.1.4 Elementos potencialmente tóxicos (EPT)

A nivel mundial, la contaminación por metales pesados es uno de los mayores problemas que afecta la salud humana (Gamalero, *et al.*, 2009). Debido a que son elementos no degradables, inmutables y persistentes en el ambiente (Lebeau, *et al.*, 2008), pueden movilizarse en el suelo, en el aire y en el agua mediante cambios en su estado de óxido-reducción (Young, 2012) o incorporarse a los seres vivos a través de las cadenas tróficas.

La definición de metal pesado es impreciso debido a que no tiene una base científica rigurosa o una definición química (Ríos-Martínez, 2017), por lo que, muchos elementos que se enlistan dentro de este término están definidos como aquellos que presentan características metálicas y tienen una densidad específica mayor a 5 g cm⁻³. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) denomina

a éstos como “elementos potencialmente tóxicos” (EPT), los cuales incluyen a los siguientes: Ar, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Ag, Hg, Ti, Se y Pb (INECC, 2009). Asimismo, en cuestión de salud humana, también se consideran EPT a aquellos metales que son esenciales en cantidades traza, pero que llegan a ser tóxicos cuando su concentración se incrementa (Alloway, 2013; Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). Gran parte de los estudios realizados sobre suelos y sedimentos se refiere a la concentración total de metales, en especial cuando el estudio se encamina a concretar niveles de referencia de los metales o contenidos de fondo según diferentes litologías. El uso de esta concentración total, empleado como criterio de evaluación, para la determinación de los efectos potenciales de contaminación por metales pesados en suelos, significaría que todas las formas químicas en las que puede encontrarse el metal causan o producen el mismo impacto sobre el medio ambiente, lo que es claramente insostenible. Los EPT pueden ser retenidos en los suelos, por mecanismos de adsorción: sobre minerales de arcilla, sobre oxihidróxidos metálicos y sobre materia orgánica. (Marqués *et al.*, 2012). Sin embargo, hay EPT (Zn, Cd, As, Hg, Pb, Fe, Cu) que se encuentran presentes en el ambiente de forma natural o que han sido añadidos por actividades antrópicas.

La biodisponibilidad de los EPT depende del pH del suelo, por lo que cuando más bajo se encuentre el pH, mayor será la concentración de metales en solución y por consiguiente mayormente biodisponibles para las plantas. La movilidad de los EPT se encuentra determinada por el pH del suelo, ya que a un pH ácido aumenta la movilidad de Al, Zn, Mn, Cu, Co, Fe, y a un pH básico la de Mo y Se (Ruda *et al.*, 2004).

I.1.4.1 Fuentes de contaminación

Los metales pesados en los suelos pueden tener un origen geogénico o antropogénico, en principio el contenido de metales en suelos es debido a la meteorización del material parental, de igual forma, la erosión de los minerales provocada por el viento y la lluvia, así

como la descomposición de las rocas, son los principales procesos naturales por los cuales los metales se incorporan a la matriz suelo. La liberación de cationes de una roca por meteorización depende de diferentes parámetros como clima, topografía, permeabilidad, tiempo y actividad biológica, en particular de los microorganismos (Galán y Romero, 2008). Independientemente de los niveles de metales pesados que se encuentran de forma natural debido a la geología; las actividades antrópicas y específicamente actividades agrícolas, ganaderas, mineras, e industriales, son las fuentes más importantes de contaminación de metales pesados en suelos.

Las actividades agrícolas como el riego, el uso de fertilizantes inorgánicos, pesticidas, estiércol, enmiendas de calizas, así como la aplicación de lodos residuales incorporan al suelo diferentes cantidades de metales pesados, los plaguicidas y fertilizantes introducen este tipo de compuestos a través de los principios activos o de impurezas de su manufactura. Los metales se van acumulando en los suelos agrícolas pudiendo ser absorbidos por las plantas aun después de un largo periodo de tiempo de su aplicación como fertilizante. Los fertilizantes fosfatados son los más contaminantes y el contenido de metales pesados en estos depende del origen de las fosforitas utilizadas para su fabricación (Larios, 2014).

Otra de las fuentes de contaminación de EPTs es la industria, como las plantas de tratamiento de pilas, la minería o las industrias de producción de fertilizantes, la industria textil, así como diversas actividades como la fabricación de pinturas, baterías, estabilizadores de plástico y el sector de la automoción, estas suponen una fuente importante de Cd, Pb, Co, Cr y Zn (OCD, 2001).

I.1.4.2 Comportamiento ambiental de los EPTs

La distribución de los EPT en los diferentes entornos es una de las preocupaciones más fuertemente investigados por la comunidad científica dentro de estos podemos encontrar

los metales pesados que son unos de contaminantes ambientales más peligrosos, debido a sus propiedades específicas que impiden su biodegradación, así como a su potencial intrínseco para bioacumularse en los organismos vivos. Entre ellos están considerados Aluminio (Al), Cromo (Cr), Cadmio (Cd), Plomo (Pb), Manganeseo, etc. (Basterrechea, *et al.*, 2003; Calderón, 1997).

Los metales pesados se clasifican en dos grupos: Oligoelementos o micronutrientes, son aquellos elementos en los que los diferentes organismos ya sean plantas o animales solamente requieren en pequeñas cantidades (trazas) necesarias para cumplir con su ciclo de vida. Así como muchos elementos en cantidades más elevadas estos tienden a ser tóxicos, este grupo está conformado por As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn. Estos elementos que circunstancias naturales se encuentran en muy bajas concentraciones en las matrices de aguas y suelo han permitido el crecimiento de la flora y la fauna nativa de diferentes ecosistemas formando parte esencial de sistemas enzimáticos, como el cobalto, zinc, molibdeno, o como el hierro que forma parte de la hemoglobina. En resumen, su ausencia causa enfermedades y su exceso intoxicaciones (Guevara, 1995).

Los metales pesados cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos lleva consigo anormalidades en el funcionamiento de sus ciclos celulares. Resultan altamente tóxicos y presentan la característica de acumularse en los organismos diferentes organismos vivos. Dentro de este grupo podemos encontrar: Cd, Hg, Pb, Cu, Ni. Se consideran tóxicos cuando la concentración en el ambiente es excedida y causando deterioro significativo en la salud de los ecosistemas. La toxicidad de estos metales se debe a su capacidad de combinarse con una gran variedad de moléculas orgánicas, pero la reactividad de cada metal es diferente. Usualmente las moléculas suelen tener dentro de su estructura grupos sulfhidrilos los cuales se combinan con facilidad con los metales pesados inhibiendo ciertas actividades enzimáticas (Guevara, 1995).

1.1.5 Evaluación integral de riesgo

La evaluación de un sitio potencialmente peligrosos es necesario llevar a cabo una serie de pasos en los que se tiene que describir estimar y sobre todo cuantificar los riesgos existentes en el lugar que puedan estar afectando de forma directa e indirecta a la biota interfiriendo del mismo modo con la salud humana asociada a la exposición con los agentes presentes, para dar un diagnóstico certero es necesario el uso de la metodología integral de riesgo misma que permite conocer la magnitud de la contaminación y sus posibles efectos adversos sobre cada uno de los posibles receptores ecológicos, sin descuidar la problemática asociada con la población humana. Este proceso sistemático se puede agrupar en tres etapas explicitas en la Figura 1.

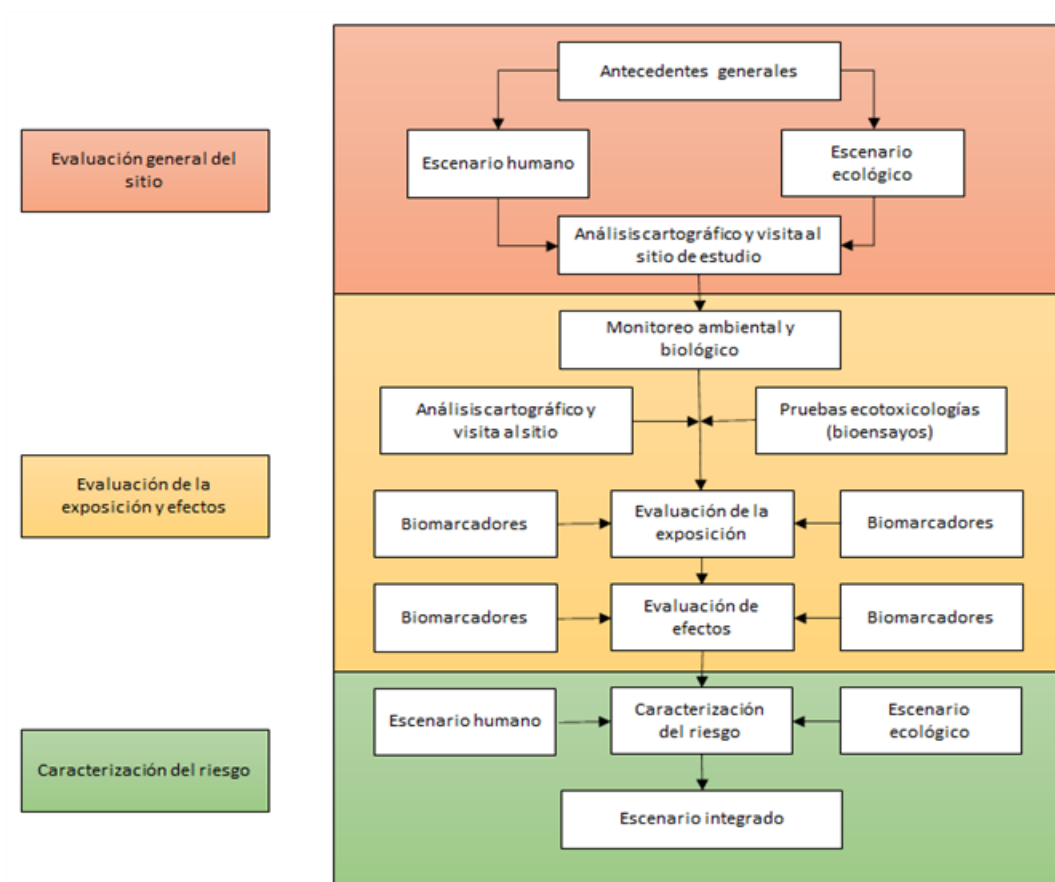


Figura 1. Etapas de la metodología de evaluación integral de riesgo aplicadas a este estudio.
(Modificada de Ilizaliturri et al., 2009)

I.1.5.1 Evaluación general del sitio

Esta etapa de la metodología permite conocer mediante la investigación (cartografía y antecedentes) la mayor cantidad de características encontradas en el sitio de estudio reuniendo la información más actualizada, dejando bases claras para la construcción de un escenario ecológico y/o humano que se encuentre perturbado bajo algún factor físico, biológico o químico, permitiendo identificar los posibles riesgos, seguidamente se realiza la visita e inspección al sitio de estudio donde se pueden mediante la visualización del lugar ratificar la información identificando de forma precisa las posibles fuentes de contaminación, los posibles contaminantes, la correcta geografía, puntos de exposición, aspectos demográficos, aspectos ecológicos y biota afectada.

Todo lo antes mencionado es empleado para realizar un plan de muestreo y selección de puntos de muestreo que sean de alta relevancia para la correcta ejecución del proyecto de investigación.

I.1.5.2 Evaluación de la exposición y efectos

Esta es una etapa crucial en la ejecución de la metodología integral de riesgo ya que permite la estimación del posible riesgo existente tanto para la población humana como para la biota que en este lugar radica, ya sea por exposición a sustancias tóxicas o sus derivadas combinaciones potenciadas por las características de la zona, estas estimaciones requieren del empleo de metodologías alternas que permitan formar un panorama general de los posibles tóxicos en el ambiente dentro de las que podemos destacar monitoreo ambiental, caracterización fisicoquímica de matrices ambientales, etc.

Estos análisis arrojan resultados específicos acerca de la dinámica de los contaminantes y sustancias tóxicas un ejemplo claro son la movilidad, presencia y bioacumulación de estas en las matrices como suelo, agua y aire, toxicológicamente los

elementos cuya toxicidad depende de sus cargas tanto positiva como negativa, son los más peligrosos ya que pueden mimetizar cationes que fisiológicamente hablando son necesarios para un correcto funcionamiento metabólico de las células, si este proceso se ve perturbado es posible que se produzcan efectos claros en su ciclo.

I.1.5.3 Bioindicadores

Debido a las alteraciones que han sufrido los ecosistemas en el mundo ha surgido la necesidad de evaluar su integridad y así evitar los daños ecológicos, económicos y de salud que implica el deterioro, el uso de bioindicadores para detectar alteraciones ambientales resultan ser un método confiable (González y Vallarino, 2014), por lo tanto se comenzaron a realizar monitoreos con organismos con el fin de obtener información sobre la distribución, mecanismo de transporte, destino y efectos de los contaminantes ambientales (Manizales, 2010-04-29).

Un organismo bioindicador se define como aquel que, por sus características de sensibilidad a las perturbaciones ambientales, distribución, abundancia, dispersión, éxito reproductivo, entre otras, pueden ser usadas para estimar el estatus de otras especies o condiciones ambientales de interés que resultan difíciles, inconvenientes o costosas de medir directamente (González y Vallarino, 2014). La elección de las especies bioindicadores dependerá de las características biológicas de los organismos, su ecología y tipo de contaminación presente en el ambiente a analizar. Si los contaminantes predominan en la matriz agua, posiblemente estén asociados al sedimento u ocupan ambas matrices del ecosistema acuático, por lo tanto, se deberán considerar aquellas especies que presenten mayor uso de estos hábitats (Torres-Bugarin *et al.*, 2010). La composición química de los contaminantes, así como la capacidad de los organismos para absorberlos, ingerirlos y metabolizarlos serán de importancia para establecer el posible efecto de estos (Buch Walter *et al.*, 2003; Flores, *et al.*, 2008)

Los bioindicadores pueden clasificarse como a) Detectores, es decir, aquellos cuya población se vea reducida por la presencia de estresores ambientales, b) Explotadores, este grupo lo integran aquellos organismos en los que por el incremento de nutrientes derivados de la contaminación ambiental aumentan de forma exponencial su población; y c) Acumuladores, aquellos cuya característica de resistencia a la presencia de ciertos contaminantes, los acumulan en su organismo a concentraciones que pueden ser medidas sin sufrir daño aparente (González y Vallarino, 2014).

Entre los grupos de organismo que han sido utilizados como centinelas en ambientes acuáticos o terrestres: se encuentra las esponjas, moluscos, peces y mamíferos por mencionar algunos (Mudry y Carballo, 2006).

Los peces son los organismos más adoptados como bioindicadores de la calidad de ecosistemas acuáticos debido al nivel que ocupa en la cadena trófica, a su capacidad de bioacumular sustancias nocivas y a su susceptibilidad a bajas concentraciones de agentes tóxicos (Missini *et al.*, 1996; Gustavino *et al.*, 2005; de Lapuente *et al.*, 2015)

I.1.5.3.1 Cyprinus Carpio (Linnaeus 1758)

El uso de los peces como bioindicadores ha cobrado gran importancia debido a: 1) su sensibilidad a los estresores ambientales, 2) su amplia distribución geográfica; 3) su presencia en virtualmente toda la cadena alimenticia; 4) su relativa sencillez para identificarlos, así como por 5) su facilidad de adaptación al cautiverio, lo que permite realizar evaluaciones del efecto de diversos estresores ambientales bajo condiciones controladas (González y Álvarez, 2014)

Las especies que pertenecen a los cypriniformes son un grupo característico debido a su gran diversidad, las familias dulceacuícolas son los de mayor número de especies en todo el mundo por lo que los convierte en excelentes bioindicadores (Nelson, 2006).

Dentro de este grupo es importante destacar a la carpa (*Cyprinus carpio*), también conocida como “carpa común” o “carpa de las Europas”, es una especie que posee una estructura corporal significativamente robusta, poco comprimido y sutilmente curvado en el vientre mientras que su dorso es ligeramente arqueado. Morfológicamente *C. carpio* L. (Figura 2) tiene el cuerpo robusto cubierto de escamas. Posee una boca protráctil, en la posición sub-terminal, con dos barbillas de una longitud que oscila entre los 2 y 5 cm que funcionan como sensores a cada lado ancladas a la quijada superior (Figura 2)

Esta especie carece de dientes en la cavidad oral, pero presenta unas hileras de dientes faríngeos, de tipo “molariforme”, ubicados cerca de los arcos branquiales. Al igual que otras especies de la misma familia de los cyprinidae no se encuentran escamas en la región cefálica, dejando que el contorno dorsal continúe desde la cabeza hasta encontrarse con la aleta dorsal. Presenta aletas pectorales mismas que se encuentran en posición ventral, pélvicas y anal. Los Cyprinidos presentan una talla entre los 380 y 470 mm, aunque puede llegar a los 1000 mm en hábitats favorables y puede alcanzar un peso de 400 g en un periodo de 6 a 12 meses (Kottelat y Freyhof, 2007).

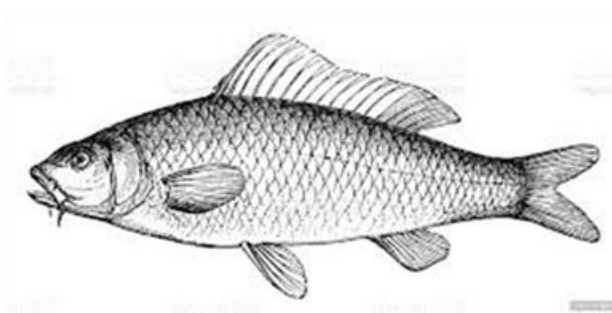


Figura 2. Imagen de *Cyprinus Carpio*

Su hábitat se restringe a la capa profunda de la columna de aguas con una temperatura que va desde los 1°C hasta los 30°C, aunque, prefiere desarrollarse en cuerpos de agua eutróficos con climas semi templados, escasa profundidad, baja velocidad

de corriente, elevada densidad de vegetación y fondos fangosos o arenosos, por lo tanto, se pueden encontrar habitando grandes embalses, humedales, ríos, arroyos y estuarios, entre otros (Panek, 1987, FAO, 2004).

Es una especie eurioica con hábitos principalmente bentónicos, que incluye plantas sumergidas, organismos acuáticos, subproductos agrícolas y desperdicios orgánicos, con relación a la reproducción, los machos pueden alcanzar la madurez reproductiva en el primer año mientras que las hembras pueden ser hasta el segundo año de vida (Brumley, 1996). Además, la capacidad reproductiva de esta especie es muy elevada, está catalogada como una de las especies más prolíferas ya que pueden llegar a liberar hasta dos millones de ovocitos en un solo desove (Swee y McCrimmon, 1966; Swain, 1979).

Los organismos de la especie *C. carpio* presentan elevada versatilidad ecológica por lo que es considerado un excelente bioindicador de diferentes perturbaciones ambientales, evidenciada, entre otras cosas, por su tolerancia y capacidad de bioacumulación, así como su amplia respuesta a diferentes variables ambientales (Sivakumaran et al., 2003; Koehn, 2004). La carpa común se ha utilizado con éxito en estudios de evaluación de genotoxicidad tanto en estudios in vivo como in situ (debido a que se ha demostrado a través de la exposición en jaulas que puede soportar hasta cuatro semanas con un mínimo de estrés (Klobučar et al., 2010; García-Nieto et al., 2014).

I.1.5.4 Biomarcadores

Los biomarcadores son aquellas variaciones bioquímicas, histológicas fisiológicas o del comportamiento que por su capacidad de medición en células, tejidos o fluidos corporales se relacionan con la exposición a contaminantes ambientales (Fasulo et al. 2013; Chavan et al. 2017; Lima et al., 2018). Entre los numerosos biomarcadores ecotoxicológico propuestos en las últimas tres décadas, se destacan aquellos que se basan en las respuestas a nivel molecular y celular (Collins, 2004).

Existen diversos tipos entre ellos se encuentran los de exposición, éstos tienen la capacidad de dar a conocer información cuantitativa sobre el ingreso del tóxico al organismo, es decir que cuantifican la concentración de un xenobiótico y/o sus metabolitos en tejidos o fluidos biológicos, estos pueden ser específicos para una clase en particular de contaminantes ejemplo de ellos son la concentración de bifenilos policlorados en sangres, EPTs, en tejido, entre otros (Broeg *et al.* 2005; Peña *et al.*, 2003).

Otro tipo corresponde a los de efecto, estos indican los daños que el tóxico ya ha generado en el organismo y pueden ser asociados con enfermedades o deterioro. Cuando se encuentran compuestos de adición del ADN implica la acción de la sustancia tóxica sobre el órgano blanco, que ha reaccionado con él y que probablemente ha producido una lesión la cual puede ser reparada o conducir a un daño permanente. Por ejemplo, Índice hepatosomático, Índice gonadal, factor de condición, peroxidación lipídica (LPO), evolución histopatológica, neurotoxicidad (inhibición de la acetilcolinesterasa) y daños al ADN (Peña *et al.*, 2003).

Estos se utilizan para evaluar la exposición y los efectos de los contaminantes a nivel individual, celular y subcelular, y la integración de biomarcadores específicos en diferentes tipos de índices se ha convertido en una herramienta muy importante para fines de diagnóstico (Amiard-Triquet y Berthet, 2015; Colin *et al.*, 2016), el uso de biomarcadores son una primera fase de alerta de posibles perturbaciones en el entorno y en muchos de los casos son empleados para el biomonitoreo de zonas específicas (Collins, 2004) así como de determinación de la presencia de materiales que no son característicos de los ecosistemas o entornos en los que tienen interacción.

Dentro de los marcadores de efecto se encuentran los biomarcadores de genotoxicidad, los cuales permiten evidenciar las alteraciones producidas a nivel genético por agentes químicos, físicos, biológicos entre otros, ya que este incluye el daño directo al DNA o cualquier alteración que conduce a un defecto en las variaciones de la expresión de

enzimas que participan en los procesos de replicación o reparación del DNA, así como modificaciones en las fibras del huso o los centriolos, incluyendo a su vez los conceptos de mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis (Poletta, 2011).

Existen diversas pruebas para evaluar el daño al DNA provocado por determinados agentes genotóxicos, por ejemplo, el ensayo cometa y de micronúcleos, ya que, éstos pueden considerarse como un buen biomarcador en estudios de biomonitorio para la detección de la exposición de agentes clastogénicos (Zhong et al., 2001).

I.1.5.4.1 El ensayo cometa.

En los últimos años, el ensayo cometa se ha empleado para evaluar el daño y la reparación del ADN en células eucariotas individuales y tejidos de diversos organismos incluido el hombre. Los tipos de daños detectados por ensayo cometa bajo condiciones alcalinas ($\text{pH} > 13$) incluyen roturas de cadenas de ADN y sitios lábiles a los álcalis (sitios apurínicos/apirimidínicos), bases nitrogenadas alquiladas y oxidadas, enlaces cruzados ADN-ADN, dímeros de pirimidina de ciclobutano inducidos por UV y algunos aductos de ADN inducidos químicamente (Enciso *et al.*, 2018; Moller, 2018, Collins, 2023) sin embargo. El uso de enzimas reparadoras aumenta la gama de lesiones de ADN que se pueden detectar con el ensayo. También se puede modificar para medir la actividad de reparación del ADN.

Ostling y Johanson en (1984), fueron los primeros en desarrollar una técnica de electroforesis en microgel para detectar el daño al DNA a nivel de células individuales. Sin embargo, las condiciones neutrales que usaron solo permitieron la detección del daño producido por rompimiento en las dos hebras del DNA. Las condiciones neutrales limitaron la utilidad del ensayo, por lo que en 1988, Singh y colaboradores adaptaron la técnica en condición alcalina ($\text{pH } 13$), bajo estas

condiciones de pH la incrementada migración del DNA es asociada con elevados niveles de rupturas de cadenas simples (RSC) asociadas con sitios de reparación por escisión incompletos y sitios lábiles al álcali (SLA). Como la mayoría de los agentes genotóxicos inducen en mayor magnitud RSC y/o SLA que ruptura de doble cadena, esta versión del ensayo tiene mayor importancia en la identificación de los agentes genotóxicos (Dhawan et al., 2009).

El ensayo cometa se puede implementar fácilmente en laboratorio, es rápido y económico. Se ha utilizado en diversas áreas de investigación que incluyen pruebas de genotoxicidad (tanto *in vitro* como *in vivo*), biomonitorio humano, es ampliamente usado en ecogenotoxicología por exposiciones ambientales y ocupacionales (Enciso et al., 2018; Moller, 2018; Collins, 2023). Este ensayo se ha aplicado utilizando diversos modelos experimentales que incluyen hongos bacterias, especies acuáticas, entre otros. Los peces son el grupo más utilizado que adoptó el ensayo cometa como herramienta de biomonitorio de contaminantes en vida silvestre (de Lapuente et al., 2015; Bolognesi et al., 2019).

I.1.5.4.2 Ensayo de Micronúcleos (MN)

El ensayo de MN aplicado al biomonitorio de contaminantes resulta ser una importante herramienta en estudios de mutagénesis ambiental (Koppe, 2002). Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o inclusive cromosomas completos que espontáneamente o por causa de agentes externos que rompen cromosomas un ejemplo claro podrían ser las radiaciones que dañan el huso mitótico estos restos de material genético quedan fuera del núcleo durante la mitosis. El ensayo de MN se ha utilizado ampliamente en organismos acuáticos tales como moluscos bivalvos (*Mytilus galloprovincialis*), (*Crassostrea gigas* y *Chamelea mykiss*), Salmoniformes (*Umbra pigmea*), carpas (*Cyprinus carpio*), (*Carassius auratusgibelio*) o tilapias (*Oreochromis mossambica*) (Hooftman y Raat, 1982; Hose et al.,

1987; Metcalfe, 1988; Al-Sabti & Matcalfe, 1995; Vernier *et al.*, 1997; Koppe, 2002; Garcia, 2009; Okonkwo *et al.*, 2011).

Los MN son conocidos en el campo de la hematología como cuerpos de Howell-Jolly y su forma es generalmente redonda o almendrada, con un diámetro que varía desde 0.4 a 1.6 micras. Los mecanismos básicos que permiten la generación o aparición de los micronúcleos se llevan a cabo en la fase M encontrada en el ciclo celular, son prácticamente rompimientos de cromosomas acéntricos y/o algunos cromosomas retardados que no logran incorporarse al núcleo principal tal y como se observa en la figura 3. El ensayo de MN representa una herramienta apropiada para monitorear zonas donde se sospecha la existencia de eventos de contaminación, mientras que también permite analizar muestras colectadas en diferentes sitios, sin necesidad de sacrificar a los organismos ya que basta con un volumen de sangre inclusive de microlitros (Monserrat *et al.*, 2007; Bolognesi & Hayashi, 2011). Es un biomarcador que evalúa el daño a nivel cromosómico. Se ha aplicado en estudios ecotoxicológicos empleando diversas especies de vegetales (Juárez *et al.*, 2013) y animales silvestres o cultivados en el laboratorio (García *et al.*, 2014), expuestas a agentes clastogénicos y aneugénicos.

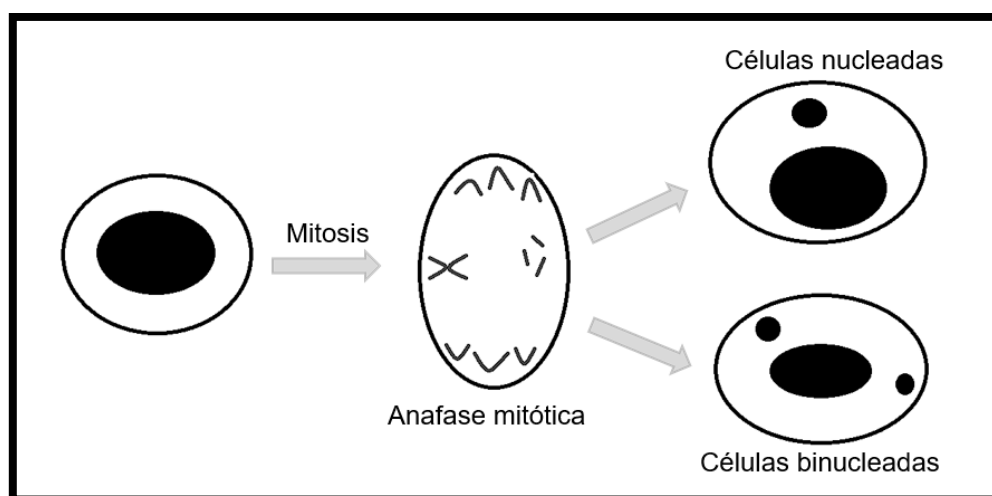


Figura 3. Formación de MN por pérdida de un cromosoma entero o fragmentos cromosómicos durante la división celular (Tomado de Tibisay-Matheus *et al.*, 2014).

Desde un punto de vista citogenético, el ensayo cometa alcalino (CA) (Azqueta y Collins, 2013) así como el ensayo de MN, que además detecta aberraciones cromosómicas y anormalidades nucleares (Fenech, 2000; Mudry y Carballo, 2006) son ampliamente usados como biomarcadores de genotoxicidad con excelentes resultados.

1.1.6 Espacios naturales protegidos

La protección y vigilancia de la naturaleza en general no es una moda en estos tiempos, simplemente ha cobrado una importancia que va en crecimiento proporcional a la fuerza que generan las diferentes acciones que el ser humano sobre el medio ambiente especialmente en los últimos años (Ponting 1992) hace mención que los descubrimientos han ayudado a entender mejor la influencia que ha ejercido el medio ambiente sobre el desarrollo de las sociedades en general pero es igualmente importante el impacto de los seres humanos sobre la tierra. Como consecuencia del desacelerado deterioro ambiental, es ampliamente aceptado que hoy en día los cambios realizados por los seres humanos están dominando más en el medio ambiente (Vitousek *et al.* 1997; Cincotta *et al.* 2000).

Como respuesta a este proceso de deterioro ambiental, se ha adoptado una política relacionada con la conservación o preservación de diferentes zonas que en tiempos recientes se han visto afectadas por el factor de crecimiento humano, entre estas medidas se encuentra el decreto de Áreas Naturales Protegidas (ANP). La eficiencia de las ANP se considera a un hoy en día muy variable principalmente por a estrecha relación entre las políticas socioculturales de cada región (Bruner, 2001)

Las ANP son también espacios humanos, en cuestiones de ejemplificación se trata de lugares que a lo largo de su historia, han tenido diferentes influencias culturales pero

que debido a la presencia del factor humano se han visto mermadas progresivamente y derivado de las actividades antrópicas se han contaminado o destruido extensas áreas de las mismas, razón por la cual deben ser protegidas, las ANP son instrumentos dinamizadores, generan considerables inversiones de diferentes recursos apoyados por el soporte legislativo de cada una de las entidades federativas que forman parte de una línea de voluntad política de conservación de la naturaleza (Mallarach 2000).

Son consideradas ANP de interés estatal las siguientes:

Parques y reservas estatales: estos se constituirán por áreas de presentación biogeográfica, donde existan uno o más ecosistemas, que bajo la regulación en vigor deban preservarse por ser de interés para la comunidad. La superficie mínima que se podrá decretar será de 100 hectáreas y máxima permisible de 1,000 hectáreas para proteger ecosistemas, cuencas y controlar la erosión; proporcionar instrumentos para la educación y recreación; preservar las especies de flora y fauna; valores históricos y culturales, así como respaldar al desarrollo rural de la región (Art. 47 LEEPA).

Parques ecológicos: se constituirán por áreas naturales protegidas de vegetación natural o inducida, de ubicación urbana o rural, con representación de la flora y la fauna regionales. Pueden incluir la presencia de valores históricos o culturales. Su superficie se decidirá para cada caso en particular. Dan protección a zonas verdes urbanas y fijan límite a la expansión de asentamientos humanos, controlan la erosión; sirven como instrumento para la educación ambiental; proporcionan la recreación ecológica y el desarrollo de las actividades deportivas; protegen a los ecosistemas, a los valores históricos y culturales; ofrecen medios para la investigación y apoyan el desarrollo rural. (Art.49 LEEPA)

Parques urbanos: Son aquellas áreas de uso público, constituidas por el Gobierno estatal y los diferentes municipios en los centros de población para alcanzar y preservar el equilibrio en los ecosistemas urbanos industriales entre las construcciones, equipamientos e instalaciones respectivos y los elementos de la naturaleza, de manera que se proteja un

ambiente sano, el esparcimiento de la población y los valores artísticos y de belleza natural que se signifiquen en la localidad (Art. 50, LEEPEA)

1.1.7 Área de estudio.

El área natural protegida (ANP) La Cueva (Figura 4) se ubica dentro de la cuenca del Alto Atoyac en el centro-sur del estado de Tlaxcala en el municipio de Apetatitlán de Antonio Carvajal, se declaró bajo el régimen de Reserva Ecológica (RE) dentro del parque ecológico Diego Muñoz Camargo en el año de 1998, se ubica sobre un valle plano rodeado de lomeríos, cuenta con una superficie de 5 hectáreas. La reserva está conformada por aproximadamente 12 manantiales originados por las infiltraciones de zonas altas aledañas al sitio 9 de los éstos dan caudal al río principal que toma el mismo nombre del ANP, este cual tiene una extensión aproximada de 1.7 km desde su origen hasta su confluencia con el río Zahuapan, principal corriente del estado de Tlaxcala (SMA, 2023). Los 3 restantes alimentan un humedal artificial construido en el centro de la reserva, cuenta con una profundidad promedio de 1.5 m ocupa una superficie aproximada de 2240 m², funge como regulador de temperatura y sirve como hábitat de animales silvestres dentro de los que se encuentran 24 especies de aves, así como de especies acuáticas como la carpa arcoíris, la común y la carpa espejo todas pertenecientes a la especie *Cyprinus*.

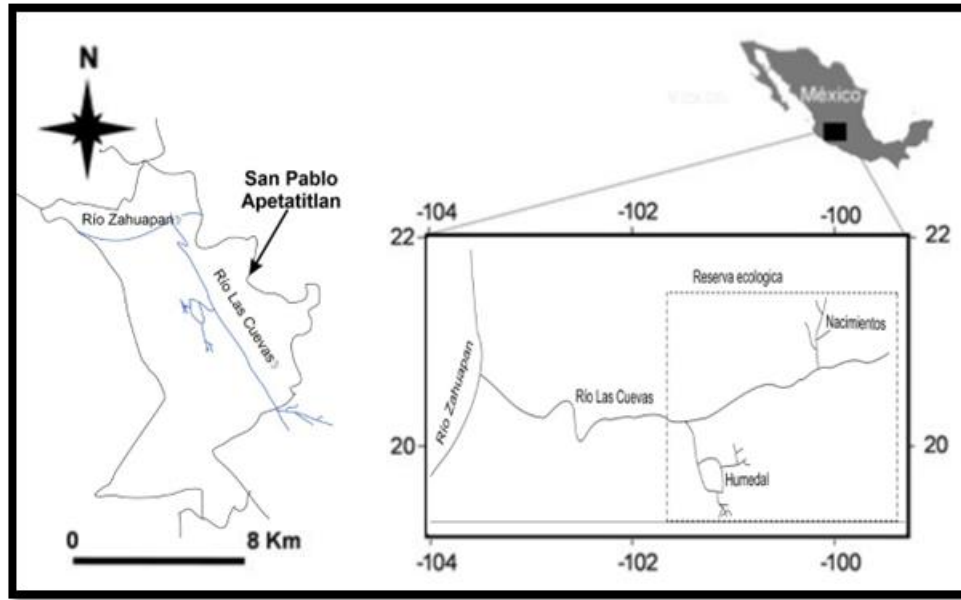


Figura 4. Ubicación del ANP La Cueva, Apetatitlán de Antonio Carvajal, Tlax.

El volumen de estos cuerpos de agua es determinado por la precipitación, la evapotranspiración y la infiltración de los manantiales, el nivel de agua dentro del humedal está regulado por una pequeña represa, mientras que en el río las cuevas el caudal ha registrado una altura máxima de 2.4 metros en época de lluvias y en temporada de estiaje una mínima de 50 cm. Este lugar está considerado como una gran meseta con cañadas o barrancas con profundidades moderadas que van desde los 3 hasta los 5 m, en el área predominan los suelos aluviales de rocas ígneas extrusivas que a la vez están formados partículas de arenas y arcillas de diferentes tamaños (GMA, 2023; SMA, 2023).

El agua de los manantiales identificados en la zona se utiliza para alimentar al cuerpo de agua principal, lo que permite mantener un flujo constante cubrir las necesidades básicas de los organismos que habitan el lugar además de alimentar algunos estanques donde se cultivan especies acuáticas como carpa común o tilapia, otras actividades antrópicas que se realizan en la zona son el lavado de ropa en lavaderos contruidos en la periferia de los manantiales, a lo largo del cauce del río se observan diferentes salidas de drenajes tanto industriales como municipales esta información fue vital para la selección de los puntos de muestreo.

Dentro de esta RE se identifican áreas específicas como son: el parque ecológico y parque jardín donde se han identificado diferentes especies de aves endémicas y migratorias destacando a la garza blanca, el gorrión barbinegro, el chipe de cara negra y la tórtola sabanera, además en el parque jardín se encuentran especies de árboles de jacaranda e higuierillas, considerados exóticos. Un dato importante es la ubicación del panteón “la Piedad” en el límite con el RE, mismo que data del año de 1892 y en el cual se puede apreciar diferentes acabados de la época (GMA, 2023).

El río las Cuevas es un efluente que nace dentro la reserva ecológica que como se mencionó anteriormente se forma por el caudal de diferentes capacidades que van desde los 2 m³/s hasta los 5 m³/s estas vetas nacen de un conjunto de rocas ígneas dentro de una barranca así también en temporada de lluvias que comprende el trimestre agosto-octubre el caudal de este río es afectado debido a que se adjuntan escurrimientos provenientes de las laderas del volcán la malinche esto por medio de un lecho de río seco que se extiende por aproximadamente 6.17 km de longitud constituido por roca detrítica arrastrando desperdicios de las zonas adyacentes constituido por desechos orgánicos e inorgánicos (CGE, 2018).

I.2 Antecedentes

Las perturbaciones provenientes de efectos naturales o antrópicos en muchos de los casos superan significativamente a la capacidad de mantener las funciones y procesos clave de un ecosistema llevándolos a un punto de inflexión que puede causar incapacidad de recuperación, esto se demuestra a través de estudios que evidencian el efecto que ha tenido la contaminación en los ecosistemas acuáticos.

Kontas y Bostanci, (2020), realizaron un estudio en la parte del río Melet, la cual es utilizada como fuente de agua potable, pero está fuertemente afectada por desechos de origen doméstico, industrial y agrícola, esto ha implicado la acumulación de contaminantes con capacidad genotóxica. Se cuantificaron metales y metaloides en el agua, sedimento y en el músculo de peces encontraron que el Fe, Al y Mn fueron los elementos que presentaron mayor concentración en las tres matrices, la evaluación genotóxica se realizó en peces de la familia Cyprinidae (*A. chalcoides*), los resultados demostraron incremento significativo en la frecuencia de MN de los peces expuestos (5.10 ± 0.94 MN/1000 cel) con respecto a los peces de un sitio considerado de referencia (3.65 ± 0.65 MN/1000), con respecto al ensayo cometa todos los parámetros evaluados se incrementaron significativamente con respecto al sitio de referencia. Los resultados demostraron que el ADN de *A. chalcoides* se vio afectado por metales pesados que se originaron en la diversidad de fuentes antrópicas que se ubican en el sitio.

Se realizó un estudio en la Presa de Tenango (Puebla, México) para determinar la calidad del agua y su impacto sobre *Oreochromis niloticus*, se evaluaron los parámetros fisicoquímicos del agua (temperatura, oxígeno disuelto, pH y dureza) y el contenido de metales (cadmio, cromo, cobre y plomo), además las concentraciones de metales, los factores de bioconcentración y los niveles de metalotioneína en hígados y tejidos musculares de *O. niloticus*. Los parámetros fisicoquímicos del agua se encontraban dentro de rangos aceptables, mientras que las concentraciones de metales sugirieron que este

recurso no es apto para uso urbano. Los niveles de metales en los tejidos de los peces excedieron los límites aceptables para el consumo humano lo cual fue confirmado con el factor de bioconcentración indicando su acumulación potencialmente en los organismos. Los niveles de metalotioneína en hígado y músculo mostraron una correlación directa con las concentraciones de metales en estos tejidos, los resultados obtenidos indican que este recurso es peligroso para la salud pública y que el uso urbano debe ser restringido (Muñoz-Nájera *et al.*, 2018)

Mena-Mejía *et al.* (2017) evaluaron la condición ecológica del río Zahuapan de diferentes puntos perturbados (ecosistemas forestales, donde la perturbación por actividades humanas es mínima, áreas con influencia de alguno de los factores de perturbación de la condición del río: agrícola-pastizal, agrícola, urbano e industrial y urbano-industrial) dentro de estos sitios evaluados la presa de Atlangatepec fue uno de ellos, evaluando algunos parámetros físicos y químicos, los cuales, tienden a ser mayores en los sitios perturbados; Temperatura (T): 14.10 °C, Oxígeno disuelto (OD): 1.70 mg/L, Sólidos disueltos totales (SDT): 525 mg/L y pH 8.0) que en los de referencia (T 1.40 ° C, OD 6.96 mg/L, SDT 59 mg/L y pH 7.8) excepto el OD, que es mayor en los sitios de referencia, mencionan que el punto continuo a la presa de Atlangatepec presenta una condición favorable, debido a que está ubicada aguas arriba del sitio, la cual recibe y retiene las descargas de aguas residuales.

En un estudio realizado en el manantial Huactzinco, empleando a *Cyprinus carpio* L. como bioindicador, se compararon los diseños experimentales *in situ* e *in vivo*, obteniendo una frecuencia de MN de $108.6 \pm 32/1000$ y fragmentación del DNA de 143.4 ± 35 unidades arbitrarias (ua) estadísticamente superior al testigo negativo 10.9 ± 6 MN/1000 y 67.6 ± 23 ua, mientras que el experimento *in situ* mostró una frecuencia de MN de 93.3 ± 15 MN/1000 y el ensayo cometa 173.7 ± 24 ua. El ensayo cometa resultó ser más sensible

para detectar la genotoxicidad con una concentración efectiva media (EC50) de 11.4 ± 3.4 %, menor a la obtenida con el ensayo de MN (54.8 ± 3.2 %) (García-Nieto *et al.* 2014)

Se realizó una evaluación ecotoxicológica en dos presas del estado de Tlaxcala (Atlangatepec y Lázaro Cárdenas), se cuantificaron las concentraciones de EPTs en agua, sedimento y tejido de peces de la especie *Cyprinus carpio* L., así como del daño al DNA a través de la frecuencia de MN en eritrocitos sanguíneos. Los resultados en agua indican la presencia de Pb tanto en la presa de Atlangatepec (0.34-1.05 mg/L) como en la de Lázaro Cárdenas (0.59-1.40 mg/L) rebasando los límites máximos permisibles de contaminantes para protección de vida acuática mencionado en la NOM-001-ECOL-1996, para el caso de los sedimentos únicamente en la presa de Atlangatepec las concentraciones de Pb (58.9-786.1 mg/Kg) y Cr (1.1-104.8 mg/Kg) fueron superiores a la norma canadiense (ISQG: Guía Provisional de Calidad del Sedimento), en esta misma la concentraciones media de Pb en tejido muscular de los peces capturados en el sitio fue de 395.7 ± 125.3 mg/kg este valor fue superior a lo mencionado en el Codex-Alimentarius (>0.3 mg/kg) Con respecto a la evaluación de la genotoxicidad la frecuencia de MN osciló entre 25 ± 15.56 MN/1000 y 69.5 ± 6.36 MN/1000 en Atlangatepec mientras que en Lázaro Cárdenas fue de 11.5 ± 7.78 a 41 ± 14.14 MN/1000, en ambos casos los valores fueron de 2 a 8 veces más altos que el valor estimado en peces de referencia (8.25 ± 2.12 MN/1000 CT), estos resultados junto con el coeficiente de peligro (CP) que en ambos sitios para Pb como para Ni fueron superiores a 1, indican riesgo para flora y fauna (González-Pozos, 2019).

I.3 Preguntas de investigación

¿Existen fuentes de contaminación cercanas a la reserva ecológica Las Cuevas que emitan compuestos tóxicos que pudieran representar un riesgo para este ecosistema?

¿En el agua de la RE las Cuevas existen compuestos xenobióticos que puedan generar un efecto genotóxico y citotóxico en *C. Carpio*?

¿El agua de la RE Las Cuevas tendrá una contribución ecotoxicológica sobre el río Zahuapan?

I.4 Hipótesis

Si al agua de la RE las cuevas como resultado de las actividades antrópicas, se vierten diversas sustancias capaces de generar un efecto genotóxico y citotóxico, entonces peces de la especie *C. carpio* al exponerse a esta, presentarán daño al DNA evidenciado por el incremento en la frecuencia de micronúcleos, así como en el índice de daño al DNA.

I.5 Justificación

Debido a que Las Cuevas es un ANP y dada la importancia ecológica y cultural que ha adquirido en los últimos años, este sitio puede ser catalogado como de alta relevancia, ya que tiene como objetivos clave la protección y conservación de biodiversidad y contribuir con la creación de un corredor urbano que contribuya con la reproducción de la flora y la fauna nativa, así como el aprovechamiento de los yacimientos de agua naturales.

Sin embargo dada la información que se tienen acerca del nivel de contaminación que presentan los efluentes del estado de Tlaxcala derivado de las actividades antrópicas que delimitan sus cauces, deteriorando y en muchos de los casos destruyendo el hábitat y a la nula información que existe sobre la presencia de contaminantes y los efectos que sobre la biota pueden tener en este sitio, surge la necesidad de realizar una investigación que permita conocer las concentraciones de algunos EPTs (Pb, Cd, As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, y Zn) en muestras de agua, sedimento y tejido muscular de peces cultivados y expuestos a agua de diferentes puntos de este ecosistema así como evaluar el daño al DNA que se pudiera estar generando sobre la biota con el fin de identificar el posible riesgo ambiental derivado de las actividades que se desarrollan dentro y fuera de este. De tal manera que los resultados sirvan como sustento para establecer las estrategias que permitan tomar las medidas adecuadas y oportunas para evitar el deterioro al medio ambiente y protección de la biodiversidad.

I.6 Objetivos

I.6.1 Objetivo General

Evaluar el riesgo ecotoxicológico del agua de la RE las Cuevas, mediante los efectos citotóxico y genotóxico producidos por exposición de *C. Carpio* como bioindicador para conocer el potencial de toxicidad de este ecosistema.

I.6.2 Objetivos Específicos

- Identificación de las fuentes de contaminación del agua de la RE las Cuevas mediante la visita e inspección al sitio para ubicar puntos de muestreo.
- Caracterización del agua y sedimento de los puntos de muestreo mediante la determinación de parámetros fisicoquímicos para conocer la cinética ambiental de los contaminantes.
- Determinación de índice morfométrico de *C. carpio* para conocer sus condiciones biológicas.
- Evaluación de la capacidad genotóxica del agua de la RE las Cuevas a nivel molecular y cromosómico mediante los ensayos cometa y micronúcleos, así como el daño citotóxico cuantificando la frecuencia de células apoptóticas y necróticas en eritrocitos de *C. carpio*. para contribuir al conocimiento del riesgo potencial de este ecosistema.

2. METODOLOGIA

2.1 Puntos de muestreo

El sitio de estudio fue al área de la reserva ecológica Las Cuevas en la comunidad de San Pablo Apetatitlán, Tlaxcala, para la selección de los puntos de muestreo se realizó la visita e inspección al sitio de estudio con la finalidad corroborar la información obtenida en la revisión bibliográfica e identificar fuentes potenciales de contaminación y de exposición de la biota existente. Para este estudio se siguió parcialmente la metodología para la evaluación integral de riesgos en sitios potencialmente contaminados (Ilizaliturri *et al.*, 2009). Los recorridos se realizaron entre los meses de abril 2021 a enero del 2022.

2.2. Muestreo ambiental

Las muestras de agua en cada uno de los puntos seleccionados se tomaron en recipientes de polietileno previamente lavados con ácido nítrico al 10%, para la caracterización fisicoquímica se utilizaron frascos de 5 L, para la cuantificación de EPT de 100 ml a esta además se le adicionaron 100 µL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado para evitar la pérdida de metales y en recipientes de 20 L para la exposición *in vivo* de los peces. Las muestras se tomaron introduciendo el recipiente completamente en el agua, a contra flujo de corriente, previo enjuague del recipiente, se además que la muestra no se contaminara con sedimentos del fondo (PROY-NMX-AA-121/1-SCFI-2008).

En los mismos puntos se tomó una muestra de sedimento superficial aproximadamente de 1kg con ayuda de una espátula de plástico en recipientes de polietileno, previamente lavados con ácido nítrico al 10%, una vez obtenida la muestra se retiró el excedente de agua (NMX-AA-132-SCFI-2006 8/29).

Las muestras se trasladaron en frío al Laboratorio de Toxicología y Química Ambiental (LTyQA) del Centro de Investigación en Genética y Ambiente (CIGyA), una vez en el laboratorio las muestras de agua se refrigeraron hasta su análisis, mientras que los

sedimentos se colocaron en recipientes de polietileno y se introdujeron a una estufa a temperatura de 40 °C para su deshidratación, una vez secos se homogenizaron con ayuda de un mortero, posteriormente se pasaron por un tamiz con maya de 600 µm, finalmente se colocaron en bolsas y se guardaron en refrigeración hasta su análisis.

2.3. Análisis fisicoquímicos de agua

2.3.1. *In situ*

En el sitio obtuvieron los parámetros fisicoquímicos de potencial de hidrogeno (pH), temperatura (T), conductividad eléctrica (CE mS/cm), oxígeno disuelto (OD) así como sólidos disueltos totales (SDT) utilizando un equipo multiparamétrico marca HANNA Instruments modelo HI 9828 previa calibración.

2.3.2. *Laboratorio*

2.3.2.1. Determinación de pH (NMX-AA-008-SCFI-2000)

En un vaso de precipitado se colocaron 250 ml de muestra y se determinó el pH con un potenciómetro marca DENVER INSTRUMENT, modelo 215 pH previa calibración con soluciones buffer pH 4, 7 y 10.

2.3.2.2. Determinación de cloruros

En un vaso de precipitado se colocaron 100 ml de muestra adicionando de 3 a 5 ml de solución de hidróxido de aluminio al 1% para acondicionar la muestra, posteriormente se mezcló y filtró con papel filtro Whatman No. 1 y presión negativa para acelerar el proceso, una vez filtrada la muestra se separaron 50 ml y se colocaron en un matraz Erlenmeyer ajustando el pH entre 7 y 10 utilizando hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 N y/o Ácido clorhídrico (HCl) al 0.1 N.

Una vez ajustado el pH se adicionó a la muestra 1 ml de disolución indicadora de cromato de potasio (K_2CrO_4), para titularse con una disolución patrón de nitrato de plata ($AgNO_3$) hasta virar de amarillo a naranja rojizo, al mismo tiempo se realizó la titulación de un blanco de reactivos. La concentración de iones cloruro en la muestra original expresados en mg/L se obtuvo mediante la siguiente ecuación.

$$Cl^- = \frac{(A - B) \times (N) \times (35.450) \times (1000)}{\text{mL de la muestra}}$$

Donde:

A= volumen (ml) de disolución de $AgNO_3$ gastados en la valoración.

B= volumen (ml) de disolución de $AgNO_3$ gastados en la valoración del blanco.

N= normalidad $AgNO_3$.

2.3.2.3. Determinación de oxígeno disuelto (OD) NMX-AA-012-SCFI-2001 y DBO₅ (MNX-AA-028-SCFI-2001)

El OD se obtuvo a partir de la determinación de DBO₅, frascos de tipo Winkler se llenaron al tope con las muestras de agua cuidando de no generar burbujas enseguida se agregó 2 ml de sulfato manganoso (II) y 2 ml de álcali-yoduro, la combinación de estas sustancias forma un precipitado de color café indicando la presencia de OD en caso contrario se formará un precipitado de color blanco.

Las botellas se taparon con cuidado y se agitaron, vigorosamente durante 30 segundos, se dejaron reposar por 5 min, enseguida se adicionaron 2 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) nuevamente se tapó y se mezcló por inversión hasta lograr la disolución total del precipitado, se colocaron en refrigeración por 5 días, pasando este tiempo se tomó una alícuota de 100 ml de la muestra y se colocó en un matraz Erlenmeyer se agregaron de 3 a 5 gotas de indicador de almidón y se tituló con una solución patrón de tiosulfato de sodio

0.025 M hasta el viraje de color café a incoloro, al mismo tiempo se preparó un blanco de reactivos. La concentración de OD en mg/L se obtuvo mediante la siguiente formula.

$$\frac{mg}{L} de OD = \frac{(M)(V)(Eq)(1000)}{\text{volumen real de muestra}}$$

Donde:

M= normalidad del tiosulfato de sodio

V = volumen del tiosulfato utilizado para la titulación

Eq= peso equivalente del oxígeno (8)

98.7 = volumen corregido por el desplazamiento de los reactivos agregados a la botella tipo Winkler

Posteriormente se determinó el oxígeno disuelto final de la misma forma que el inicial. La cantidad de oxígeno disuelto, y la DBO₅ se obtuvieron mediante la aplicación de las siguientes expresiones:

$$\frac{mg}{L} OD = \frac{(A)(N)(eq)(1000)}{\text{Vol de muestra}}$$

$$DBO_5 \text{ mg/l} = (\text{mg/l } OD_i) - (\text{mg/l } OD_5)$$

Donde:

OD = Oxígeno disuelto en mg/l.

A = Volumen gastado de tiosulfato

N = Normalidad del tiosulfato.

eq = Peso equivalente (gramos equivalentes de oxígeno).

Volumen d muestra = Volumen corregido por el desplazamiento de los reactivos agregados a la botella Winkler.

DBO₅ = Demanda bioquímica de oxígeno al quinto día en mg/l.

OD_i = Oxígeno disuelto inicial en mg/l.

OD₅= Oxígeno disuelto al quinto día en mg/l.

2.3.2.4. Determinación de dureza total.

Se colocaron 50 ml de muestra en un matraz Erlenmeyer y se agregan 2 ml de una solución buffer pH 10, enseguida se adicionaron 10 gotas de indicador negro de eriocromo T la muestra se valoró con una solución de EDTA al 0.01 M hasta lograr un vire de color vino a azul claro, al igual que las mediciones anteriores se realizó la valoración de un blanco. La dureza total se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Dureza total} \frac{\text{mg}}{\text{l CaCO}_3} = \frac{(\text{ml de EDTA})(1000)(Fc)}{(\text{ml de la muestra})}$$

Donde:

Fc =mg Ca en 1 ml de EDTA

2.3.2.5. Determinación de alcalinidad a la fenolftaleína y alcalinidad total

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 100 ml de muestra, se agregaron de 3 a 5 gotas del indicador fenolftaleína y se tituló con una solución de HCl al 0.02 N hasta que la solución en el matraz pierda la coloración, indicando con esto que la solución alcanzo un pH de 8.3 marcando el final de la prueba. La alcalinidad a la fenolftaleína se obtiene mediante la siguiente formula:

$$\text{alcalidad} \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \frac{(\text{A})(\text{N})(50)(1000)}{\text{volumen real de muestra}}$$

Donde

A= volumen de HCl gastados en la valoración

N= Normalidad del HCl

Para la determinación de la alcalinidad total se utilizó la muestra a la que se le determino la alcalinidad a la fenolftaleína se agregaron de 3 a 5 gotas de indicador anaranjado de metilo y se valoró con ácido clorhídrico al 0.02 N hasta el vire de amarillo a un color canela indicando un pH 4.6 marcando el final de la valoración. La alcalinidad total se obtuvo aplicando la siguiente ecuación

$$alcalidad \frac{mg}{L} = \frac{(A)(B)(50)(1000)}{\text{volumen real de muestra}}$$

Donde

A= ml de HCl gastados en la valoración

B= Normalidad del HCl

2.4 Análisis fisicoquímico de Sedimento

2.4.1. Determinación de pH

El pH se obtuvo por el método AS-02 de la NOM-021-SEMARNAT-2000, este se obtiene a través del método electrométrico para la determinación en una solución de agua pura basándose en la determinación de la actividad de ion H mediante el uso de un electrodo cuya membrana es sensitiva al H. En el caso de los suelos el pH se mide potenciométricamente en la suspensión sobrenadante de una mezcla de relación suelo agua 1:2.

Se pesan 10 g de sedimento y se colocaron en un vaso de precipitados, se adicionó 20 ml de agua destilada. se agitó en un agitador orbital marca Barnstead internacional modelo 2345, durante 30 min a intervalos de 5 min pasado este tiempo se dejó reposar durante 15 min, transcurrido el tiempo la suspensión se agitó nuevamente y se midió el pH con un potenciómetro marca Denver Instrument Modelo 215.

2.4.2. Determinación de materia orgánica (MO)

Este procedimiento se realizó bajo el método AS-07 de Walkley y Black (NOM-021-SEMARNAT-2000) con éste se permite detectar entre un 70 y 80% del carbón orgánico total por lo que es necesario hacer uso de un factor de corrección. El método se basa en la oxidación del CO del sedimento por medio de una disolución de dicromato de potasio

(K₂Cr₂O₇) y el calor de reacción que se genera al mezclarla con ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado.

Se colocaron 0.5 g de sedimento seco en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, se adicionaron 10 ml de solución de K₂Cr₂O₇ 1N y 20 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado se agitó suavemente en círculos concéntricos, para asegurar que la muestra quedara en contacto con los reactivos, se dejó reposar por 30 min evitando el cambio brusco de temperatura, pasado el tiempo se añadieron 200 ml de agua destilada y 5 ml de ácido fosfórico (H₃PO₄) concentrado y se agitó para homogeneizar la solución, finalmente se agregaron 7 gotas de indicador difenilamina (C₆H₅)₂NH, la titulación se realizó con sulfato ferroso (FeSO₄) 1M gota a gota hasta el viraje a un color verde claro a la par se procesó un blanco de reactivos El porcentaje de MO se obtuvo con las siguientes ecuaciones.

$$\% C \text{ orgánico} = \frac{(B) - (T)}{(g)} (N)(0.39)mcf$$

$$\% \text{ de materia organica} = (\% C \text{ Orgánico})(1.724)$$

Donde:

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

g = Peso de la muestra empleada (g).

mcf = factor de corrección de humedad.

2.4.3. Determinación de textura.

La determinación de textura es uno de los procedimientos estándar en los análisis fisicoquímicos de sedimentos se determina por el método de Bouyoucos (NOM-021-SEMARNAT-2000) y permite identificar la proporción relativa de grupos dimensionales de

partículas que lo constituyen. Se pesaron 50 g de sedimento y se colocaron en un vaso de precipitado de 500 ml, se agregó 40 ml de agua oxigenada para eliminar la materia orgánica, se dejó evaporar y se repitió hasta que no hubo efervescencia, nuevamente el sedimento se dejó secar, se homogenizó y se pasó a un vaso metálico se agregó agua hasta 2 cm por arriba de la superficie de la muestra, se adicionaron 5 ml de oxalato de sodio y 5 ml de meta silicato de sodio dejando reposar durante 15 min, enseguida se dispersan por 5 min en un agitador eléctrico, posteriormente se transfirió a una probeta de 1000 ml, enjuagando el vaso con una piceta se agregó agua destilada hasta completar un litro con el hidrómetro dentro de la suspensión, inmediatamente se introduce un agitador de mano para dispersar la muestra durante un minuto.

Se tomaron las lecturas con el hidrómetro a los 40 segundos y después de 2 h de terminada la dispersión con el agitador de mano, para hacer la lectura se colocó el hidrómetro 20 segundos antes del momento de la determinación cuidando de alterar lo menos posible la suspensión, al mismo tiempo se tomó la temperatura, cuando se realizó la lectura si se acumuló espuma alrededor del hidrómetro, se agregaron unas gotas de alcohol etílico para hacer una correcta lectura. El contenido de arena, limo y arcilla se determinó con las siguientes fórmulas:

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

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

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

La clase textural del sedimento se identificó con el triángulo de texturas de la USDA (United States Department of Agriculture) sobreponiendo los datos según lo mencionado en la NOM-021-SEMARNAT-2000.

2.5. Cuantificación de EPT en agua y sedimento.

2.5.1. Digestión

Para la cuantificación de EPTs se realizó una digestión en medios ácidos utilizando un horno de microondas marca CEM modelo MARS 6.

De la matriz agua se colocaron 45 ml de la muestra en un tubo de teflón Xpress y 5 ml de ácido nítrico concentrado, la digestión se realizó siguiendo el método EPA 3015A (EPA,2007) posteriormente las muestras se filtraron empleando papel Whatman No 1 y se guardaron en tubos Falcon en refrigeración hasta su análisis.

Los sedimentos y tejidos se trabajaron de la misma manera, se pesaron 0.5 g de muestra y se colocaron en un vaso de teflón Xpress, se adicionaron 10 ml de ácido nítrico concentrado. La digestión se realizó bajo las condiciones del método EPA 3051 (EPA, 2007) terminado el proceso se filtraron con papel Whatman No.1, se aforaron a 50 mL con agua desionizada y se guardaron en tubos Falcon a 4°C hasta su análisis.

2.5.2. Cuantificación de EPTs por EAA

La cuantificación de los EPT se realizó mediante inyección manual en un espectrofotómetro de absorción atómica con detector de flama marca VARIAN modelo Spectro AA 880, se realizaron curvas de calibración para cada elemento (Pb, Cd, CrT, Mn Fe y Al), previo a cada análisis. Se utilizó gas acetileno y oxígeno como carburante.

2.6. Determinación del Igeo, FE y CP de EPTs en sedimento

2.6.1. Índice de geoacumulación (I-geo)

El I-geo se utiliza para evaluar cuantitativamente la contaminación del sedimento a través de la concentración de metales frente a los valores de referencia. La determinación de este índice se realizó aplicando la siguiente ecuación:

$$I_{geo} = \log_2 (C_n / 1.5 B_n)$$

Donde:

Cn = Concentración de metal en la muestra

Bn = Concentración geoquímica del metal en la corteza terrestre

1.5 = factor empleado para la detección de la mínima influencia antrópica

Para determinar la contaminación de los sedimentos se consideraron los siguientes valores establecidos por Müller (1969).

I-geo	
<0	Sin contaminar
0 -1	Sin contaminar – Moderado
1- 2	Moderado
2 – 3	Moderado – Alto
3 – 4	Alto
4 – 5	Alto- Extremo
> 5	Extremo

2.6.2. Factor de enriquecimiento (FE) de EPTs en sedimentos

El FE se utiliza como referencia para atribuir la fuente de contaminación y se calcula con la siguiente ecuación:

$$FE = \frac{\left[\frac{C_n}{C_{ref}} \right]_{muestra}}{\left[\frac{C_n}{C_{ref}} \right]_{corteza}}$$

Donde:

C_n = concentración del metal (mg/kg) en la muestra y la corteza

C_{ref} = concentración de un metal de referencia (mg/kg) en la muestra y la corteza

El elemento de referencia puede ser uno común en la naturaleza como el Al, o Fe (Hao, *et al.* 2007) en esta investigación se eligió al Fe por ser un metal con mayor presencia en el sedimento.

Los valores del FE superiores a 1.5 indican la existencia de contaminación antrópica y se clasifica en cinco categorías (Chen *et al.*, 2015).

FE		Origen del elemento
1.5 FE < 2	Deficiente	De la roca madre
2 ≤ FE < 5	Moderado	
5 ≤ FE < 20	Significativo	Indica otra fuente de enriquecimiento adicional a la roca madre
20 ≤ FE < 40	Alto	
FE ≥ 40	Extremo	

2.6.3. Cociente de peligro

Se obtuvo el cociente de peligro (CP) para los EPTs cuantificados mediante la siguiente fórmula:

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

Donde:

CP = Cociente de peligro

Ce = Concentración de exposición

Cr = Concentración de referencia

Como concentraciones de referencia se utilizan las propuestas en los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua para protección de vida acuática y para riego agrícola (CE-CCA-001/89). Considerando que cuando el CP es menor a uno el riesgo es aceptable (González-Mille *et al.*, 2010)

2.7. Muestreo biológico *in situ*

Se realizó un muestreo en temporada de estiaje en el punto 2 correspondiente al humedal artificial del ANP la Cueva, se capturaron 22 peces de la especie *C. carpio* (carpa común) las cuales son cultivadas en el sitio, con ayuda de una red tipo atarraya, los organismos se transportaron al LTyQA del CiGyA para su procesamiento y análisis (Figura 5).



Figura 5. Captura de peces (*Cyprinus carpio*) para la evaluación de exposición y efecto in situ, en el punto 2 de la zona de estudio

Una vez en el laboratorio los peces se dividieron al azar en 2 grupos ($n=7$ y $n=15$), el primero grupo constituido por 7 organismos se colocaron en acuarios de vidrio de 40 L previamente llenados con agua del sitio, la cual se fue sustituyendo gradualmente por agua de grifo hasta llegar a tener el acuario al 100% de esta agua con la finalidad de inducir un proceso de desintoxicación (Figura 6) y poder utilizarlos como un grupo control, las peceras se mantuvieron con aireación constante y a temperatura ambiente por 35 días. Los peces se alimentaron con hojuelas para peces marca “Acuario Lomas”, además durante el proceso de desintoxicación, se monitorearon los niveles de dureza y alcalinidad manteniéndolos en un nivel de 50 mg/l con el fin de mantener en óptimo estado al acuario.

El segundo grupo conformado por 15 peces se procesaron enseguida para la evaluación de exposición y efectos



Figura 6. Proceso de desintoxicación a través del cambio paulatino-progresiva del agua del sitio por agua de grifo.

2.8. Exposición *in vivo* (laboratorio)

Se utilizaron peces de la especie *C. carpio* provenientes de un centro acuícola, los cuales se trasladaron al LTyQA del CIGyA para su aclimatación y exposición *in vivo* a muestras de agua de los sitios seleccionados de la RE La Cueva.

2.8.1. Aclimatación

Una vez en el laboratorio los peces se dividieron al azar en 8 acuarios de 40 litros con agua de grifo cada uno con 7 peces (identificados como P1 a P8) a las peceras se les dotó de un sistema de aireación continua por medio de una bomba mecánica con el fin de estabilizar los niveles de oxigenación del agua, además se mantuvo una condición adecuada de temperatura acompañado de ciclos de luz y oscuridad natural, los peces se alimentaron con alimento comercial en hojuelas se colocó una malla de protección superior con un sistema de cerrado por medio de tensión perimetral. Este proceso se realizó por 30 días (Figura 7).



Figura 7. Procesamiento de aclimatación de los peces en acuarios de 40 l. previo a su exposición in vivo a agua de los diferentes puntos de muestreo de la RE La Cueva. A) Captura de organismos, B) Separación en grupos y C) Colocados en peceras.

2.8.2. Exposición

Pasado el tiempo de aclimatación a 6 de los acuarios se les cambio totalmente el agua del grifo para someter a los peces a un tiempo de exposición de 21 días al agua recolectada de los diferentes puntos de la zona de estudio identificados con las siglas P1 a P6 el acuario P7 se dejó con agua de grifo como control negativo y el P8 denominado control positivo se expuso a una solución de 0.8 ppm de $K_2Cr_2O_7$, durante el tiempo de exposición de realizó el cambio de agua en 3 ocasiones (Figura 8).

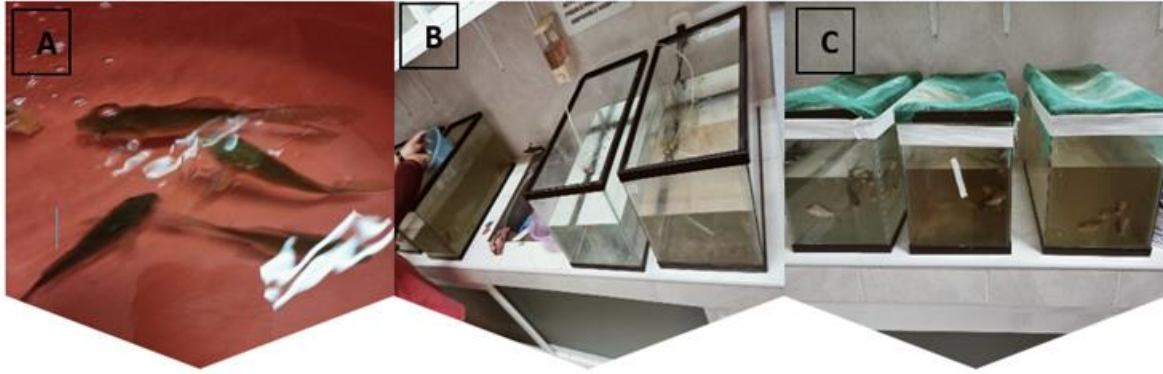


Figura 8. Exposición de peces (*C. carpio*) a muestras de agua de la RE La Cueva.

2.9. Evaluación de la genotoxicidad en *Cyprinus carpio*

2.9.1. Medidas morfométricas

A los peces tanto de la exposición in situ como in vivo se les tomaron las medidas morfométricas de peso húmedo y longitud (Figura 9) con una balanza y cinta métrica respectivamente, con ambas medidas además se determinó la condición de Fulton mediante la siguiente ecuación:

$$K=100*(gr)/Ltotal(cm) ^3)$$

Donde:

K = Factor de condición corporal de Fulton

g = peso del pez en gramos

L total = Longitud del pez en cm

Estas permiten en conjunto saber el estado de crecimiento, así como dilucidar el estado de desarrollo que tienen los organismos durante el estudio.



Figura 9. Esquema de medidas morfométricas tomadas de *Cyprinus carpio*

2.9.2. Obtención de muestras biológicas

2.9.2.1. Sangre

Una vez tomadas las medidas morfométricas de cada individuo se obtiene una muestra de sangre a través de un corte entre la cabeza y el inicio de la aleta dorsal, dejando gotear en un tubo eppendorf previamente heparinizado.

2.9.2.2. Tejido muscular

Después de tomada la muestra de sangre a cada organismo se le realiza un corte desde la abertura urigenital hasta el tórax para obtener una muestra de tejido muscular, eliminando previamente las escamas y cuidando de no tocar órganos internos, posteriormente la muestra fue cortada en trozos pequeños con la ayuda de un bisturí y colocadas en charolas de plástico (Figura 10). se introdujeron en una estufa marca Terlab a 40 °C para su deshidratación, posteriormente se guardaron en frascos de polietileno en refrigeración hasta su análisis.



Figura 10. Muestreo de tejido muscular de *C. carpio* después de la exposición in situ e in vivo a muestras de agua de la RE La Cueva. (Tomado de González, 2019)

2.10. Evaluación de genotoxicidad por ensayo de micronúcleos (MN)

2.10.1. Preparación y tinción de laminillas

Se colocaron 5 μ l de sangre en un portaobjetos previamente desengrasado con ayuda de un cubreobjetos se realizó un frotis de forma uniforme en la superficie (Figura 11), se dejaron secar por 24 h a temperatura ambiente, posteriormente las células se fijaron introduciendo las laminillas en una solución de metanol-ácido acético (3:1 v/v) por 30 min pasado el tiempo se dejaron secar a temperatura ambiente.

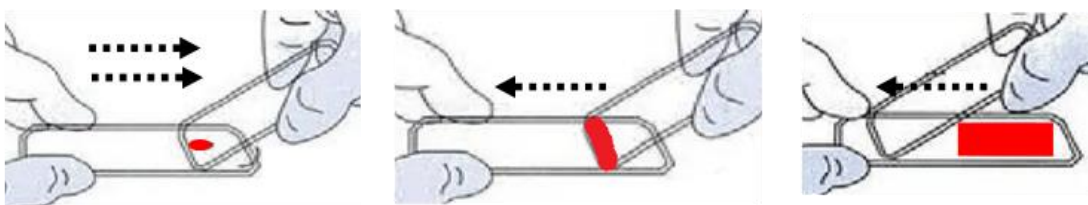


Figura 11. Técnica para el extendido de muestra sanguínea (frotis).

La tinción de las laminillas se llevó a cabo empleando dos soluciones de colorantes Eosina B y Azul de metileno (Fig. 11) introduciendo las laminillas en cada uno durante 1 min finalmente se enjuagaron con abundante agua destilada, se dejaron seca y se guardaron hasta su análisis en el microscopio.

2.10.2. Análisis al microscopio

La frecuencia de MN se obtuvo en 1000 eritrocitos por individuo aplicando los criterios propuestos por (Fenech *et al.* 2003): a) el diámetro del MN oscila entre 1/16 a 1/3 de la media del diámetro del núcleo principal; b) los MN son no refractarios; c) la intensidad de tinción del MN es similar al núcleo principal; d) el MN no está conectado con el núcleo principal; e) los MN son casi redondos u ovalados y f) los MN deben estar incluidos en el citoplasma celular.

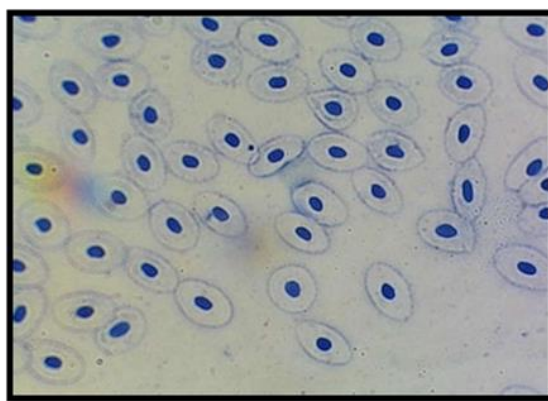


Figura 12. Micronúcleo (señalado con flecha) en eritrocitos de sangre periférica de *C. carpio*. (Cámara web salandens HD 1080P).

2.11. Evaluación de la genotoxicidad por ensayo cometa

2.11.1. Preparación de laminillas

Se agregó 165 µl de agarosa regular (AR) (SIGMA) al 0.5 %, en portaobjetos previamente lavados con metanol y secados con gasa y se extendió con el dedo índice libre de grasa, cuidando que no se formaran grumos, se solidificaron a temperatura ambiente y se guardaron hasta su uso. Posteriormente en un tubo eppendorf se agregó 10 µl de sangre y se mezcló con 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) (SIGMA) al 0.5 %, 75 µl de la mezcla se colocaron sobre los portaobjetos previamente preparados con AR y se dejaron solidificar a 4 °C, una vez solidificados se aplicó una segunda capa de ABPF. Posteriormente las laminillas se colocaron en una caja Copplin que contenía 44.5 ml de

solución de lisis pH 10, 4.5 ml de solución DMSO (Dimetil sulfoxido) y 0.5 ml de Tritón 100 X, se guardaron a temperatura de 4 °C durante 24 h.

2.11.2. Desenrollamiento y electroforesis

Las laminillas se colocaron de forma horizontal en una cámara de electroforesis Marca Thermo EC Midicell EC330 que contenía amortiguador de electroforesis recién elaborado (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM, pH>13) frío (4 °C), durante 10 min, con el fin de permitir el desenrollamiento del DNA; pasado este tiempo se aplicó una corriente de 25 V y 300 mA durante 10 min, con una fuente de poder marca Bio-Rad Modelo Power Pac Basic. Una vez transcurrido el tiempo, las laminillas se neutralizaron mediante tres lavados con Tris-base pH 7.4 durante 5 min cada vez, finalmente se lavaron con metanol por 5 min, se dejaron secar y se guardaron hasta su análisis.

2.11.3. Análisis al microscopio

Para el análisis las laminillas se tiñeron con 30 µL de bromuro de etidio (20 µg/mL) y se observaron en un microscopio de EPI fluorescencia Marca Leica Modelo DM2000. En análisis se realizó en 100 moléculas de DNA los cuales se agruparon por categorías o clases de daño (Kumaravel et al., 2009; Moller et al., 2010; García et al., 2011). a) Clase 0: DNA no fragmentado. b) Clase 1: La longitud de la cola es menor al diámetro de la cabeza. c) Clase 2: La longitud de la cola está entre una y dos veces el diámetro de la cabeza. d) Clase 3: La longitud de la cola es mayor al doble del diámetro de la cabeza (Figura 13).

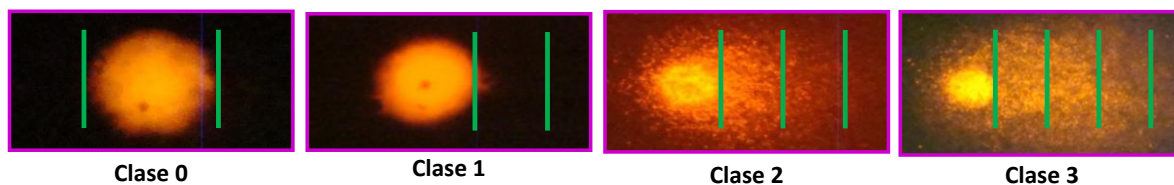


Figura 13. Molécula de DNA con las diferentes clases de daño. (Fuente: Propia).

El índice de daño para el ensayo cometa (DICA por sus siglas en inglés) osciló entre 0 y 300 unidades arbitrarias (ua) (Kumaravel et al., 2009) y se obtuvo de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$DICA = (n_0X_0) + (n_1X_1) + (n_2X_2) + (n_3X_3)$$

Donde:

n = Número de moléculas de DNA en cada una de las clases.

0 a 3 = Números de cada clase

2.12. Análisis Estadístico

Se llevó a cabo un análisis estadístico multivariante MONOVA (Multivariate analysis of variance) y una comparación entre los puntos de muestreo, de acuerdo con los resultados existe una diferencia significativa entre puntos de muestreo, por lo que se realizó una prueba de Dunnett para observar las diferencias con el punto de referencia, encontrando que en conductividad eléctrica (CE), alcalinidad, cloruros, dureza lo que indica que estas propiedades se encuentran alteradas por algunos factores del medio en el que se encuentran, mientras que el resto de parámetros como temperatura, pH, no presentaron diferencias significativas, sin embargo para procesar los resultados obtenidos partir del análisis de MN se optó por aplicar el método Dunnett que nos permitió crear intervalos de confianza para identificar posibles diferencias significativas entre la medida de nuestro grupo control y el grupo de organismos expuestos identificando posteriormente mediante una T-student que permitió determinar la media e identificar si los valores son estadísticamente diferentes entre sí.

3. RESULTADOS

3.1 Visita e Inspección del Sitio de Estudio

Desde tiempos antiguos la zona se empleaba para el cultivo de principalmente de maíz y trigo, se trata de un paisaje beneficiado del cual brotan diversos manantiales, producto de las infiltraciones de las zonas altas adyacentes, perteneciendo a la unidad fisiográfica “Gran meseta con cañadas (barrancas), estos a la vez confluyen para dar origen a la corriente principal denominada río las cuevas, dado estos beneficios de la naturaleza el hombre se ha beneficiado de ellos utilizando sobre todo el recurso agua para diversas actividades como riego de cultivos, para consumo, para recreación, entre otros. Sin embargo estas actividades han alterado la naturaleza del paisaje ya que a un costado de algunos manantiales y del río se construyeron lavaderos los cuales hasta la fecha se utilizan para el lavado de ropa, en la periferia de la RE Las Cuevas se establecieron diversas empresas dedicadas a la fabricación de cobertores y edredones durante la inspección del sitio se identificaron tubos de drenaje que correspondían a las descargas de aguas residuales de esta industrias las cuales descargaban directamente al río, al realizarse la declaratoria como Reserva Ecológica son reubicados para continuar las descargas río abajo. Recientemente se acondiciono un espacio como área recreativa y deportiva. Mediante la inspección del sitio se identificaron y ubicaron los cuerpos de agua que conforman la reserva (manantiales, río humedal) además de las potenciales fuentes contaminación dentro y fuera de ésta, las cuales fueron agrupadas en 3 áreas: La primera la conforma un área con actividades agrícolas la cual se ubica hacia el norte de la reserva en esta se cultiva principalmente maíz, el uso de agroquímicos podría representar una fuente de contaminación indirecta de los cuerpos de agua de la reserva; la segunda zona corresponde al conjunto de industrias ubicadas en los límites territoriales de la RE, en algunas de estas industrias se realiza el lavado y teñido de telas, río debajo de esta zona se ubicaron descargas de aguas residuales tanto industriales como domésticas; la tercera zona

corresponde al área urbana, además de una zona denominada de transición donde confluyen área agrícola y urbana (Figura 14).

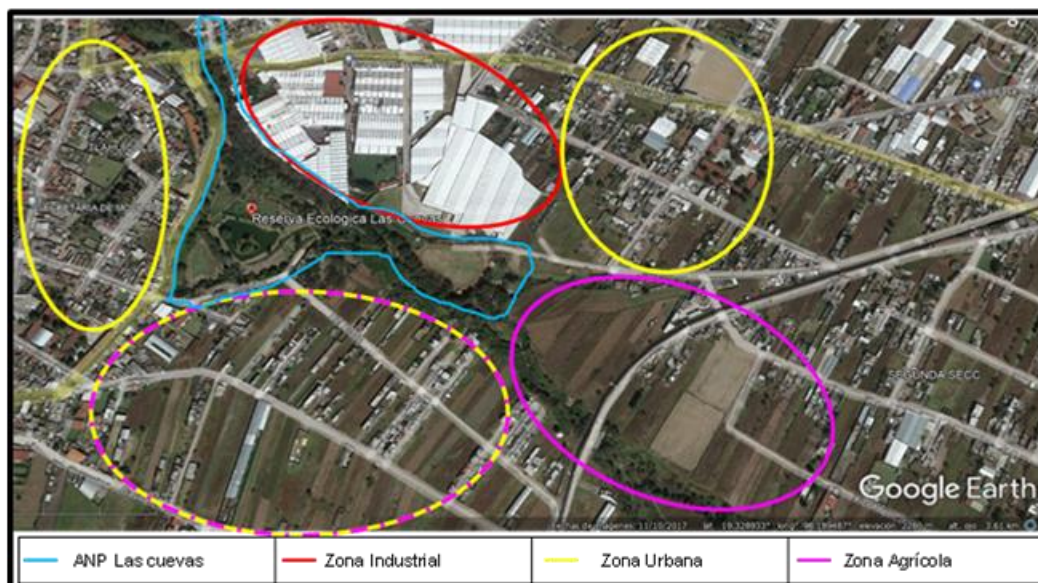


Figura 14. Delimitación de las zonas con actividades antrópicas aledañas a la RE La Cueva.

3.2. *Puntos de Muestreo*

Después de realizar la visita e inspección del sitio e identificar y ubicar los cuerpos de agua, así como las fuentes potenciales de contaminación antrópica se establecieron 6 puntos de muestreo, el P1, P3 y P4 se ubican sobre el caudal del río las cuevas el P2 corresponde al humedal y el P5 y P6 se ubicaron en el río Zahuapan (Figura 15).

Punto 1 (P1), se ubicó en el inicio del río las Cuevas, inmediatamente después de la confluencia de dos corrientes formadas por escurrimientos de los lomeríos aledaños y de algunos manantiales, las potenciales fuentes de contaminación identificadas son algunos campos de cultivo que colindan con este efluente, es importante resaltar que éstos se encuentran a una altura considerable pero que debido a la complejidad que presenta el terreno se puede considerar que podrían aportar algunos agroquímicos que se emplean en el cultivo de maíz, antes del punto están los lavaderos comunitarios los cuales se utilizan

para el lavado de ropa de los pobladores de la comunidad de Apetatitlán donde se hace uso de diferentes productos de limpieza como detergentes, suavizantes de tela, cloro, entre otros.

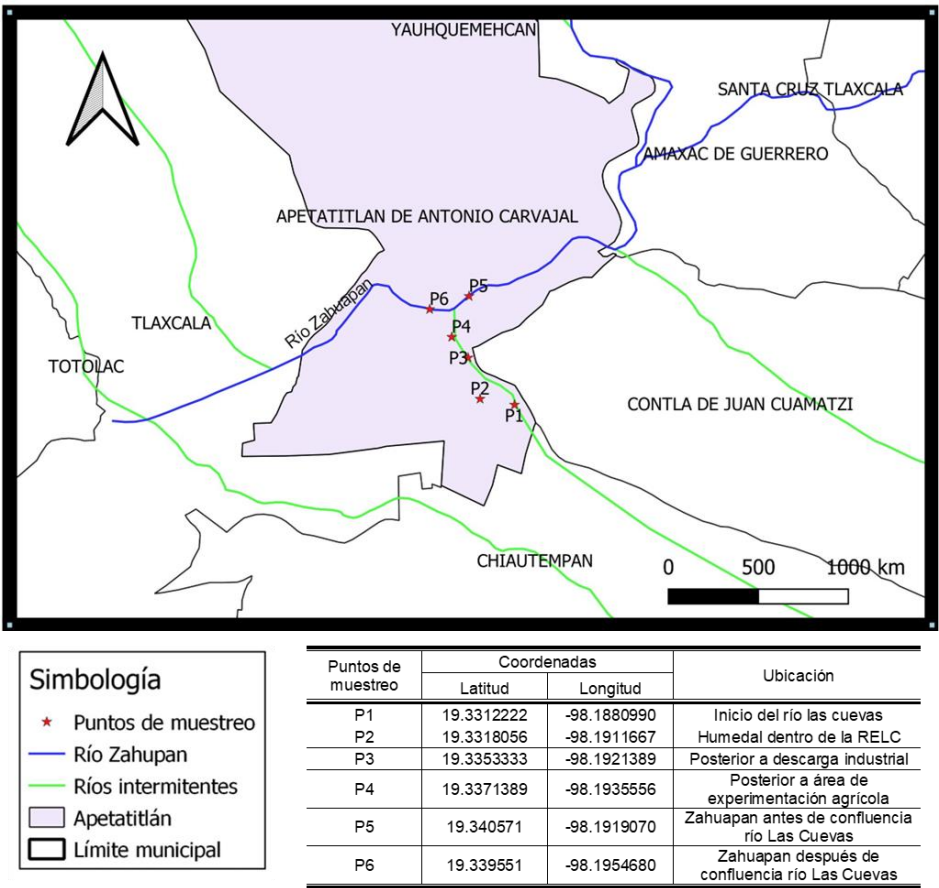


Figura 15. Localización de puntos de muestreo georreferenciados en la RE la Cueva

Por testimonio de algunos pobladores se sabe que los lavaderos se han usado desde hace casi 70 años, aunque a la fecha ha disminuido, entre otras cosas por cumplir con los objetivos de conservación del ANP, lo que ha permitido eros abandonados y las pozas que se han formado por la erosión natural para la crianza de alevines de C. carpio. En esta área se habilito un espacio como zona de esparcimiento donde se construyó una pista de atletismo, así como varias palapas para convivencia familiar, lamentablemente se pude apreciar la presencia de residuos sólidos que por arrastre llegan hasta los diferentes

cuerpos de agua de la reserva. Finalmente, también se observan tuberías presuntamente abandonadas que en su momento fungieron como medio de descargas de aguas residuales en la zona es importante resaltar que en época de lluvia se incrementan los escurrimientos a través de veredas que confluyen con el río aumentando el caudal del río (Figura 16).

Punto 2 (P2). Corresponde al humedal artificial situado en el centro de la reserva ecológica, este cuerpo de agua sirve como un regulador de temperatura del lugar y se utiliza para la crianza de especies acuáticas como la tilapia, carpa común, carpa arcoíris y el acocil especie nativa de la zona, también funge como zona de descanso para aves migratorias, algunas además encuentran espacios para anidamiento y reproducción.



Figura 16. Sitio de muestreo P1, A y C) lavaderos comunitarios, B) confluencia de pequeños arroyos y D) nacimiento de 4 manantiales.
Fuente propia: Cámara digital de resolución estándar DCX x2.

El humedal tiene una profundidad de 2.5 metros en su área más profunda y de 1.5 metros en la más somera donde se encuentra una pared que funge como compuerta para mantener el nivel del agua, se construyó a partir de las necesidades de tener una zona

recreativa que permitiera la preservación de especies, sin que sufrieran de alguna perturbación, este cuerpo de agua es alimentado por 4 manantiales del área, la corriente de salida permite la formación de riachuelos y pozas artificiales donde se mantiene la población de acociles y alevines. Estas zonas que se conocen localmente como criaderos requieren del establecimiento de programas de mantenimiento como el uso de plantas acuáticas como la elodia para su saneamiento y la reubicación de alevines para el desarrollo de nuevas comunidades de peces que en ocasiones se donan a granjas acuícolas del Estado (Figura 17).



Figura 17. Sitio de muestreo P2, A y B) humedal artificial, especies encontradas C) carpa común adulta y D) chipecillo arroyero (especie migratoria).

Punto 3 (P3). Este se ubicó sobre el río las cuevas en el límite suroeste del territorio designado para el ANP la Cueva, en este punto se unen todas las corrientes procedentes de la reserva ecológica con el cuerpo principal de agua, esta zona se encuentra señalada

por un puente que une a la comunidad de Apetatitlán con la avenida principal debajo de éste se encuentra una descarga que por sus características se presume son de origen industrial e intermitente, mientras que a escasos 3 m se ubicaron otras de origen doméstico de viviendas aledañas las cuales son continuas durante la visita e inspección se pudo apreciar que la descarga industrial es intermitente mientras que la segunda es continua con un flujo estándar, a lo largo de esta sección del río se puede apreciar el crecimiento de vegetación de tipo arbustiva y entre ella se apreciaron cantidades significativas de desechos sólidos algunos provenientes de los contenedores de basura ubicados en la periferia del campo recreativo aledaño, el mal manejo de los contenedores de basura contribuye con el desplazamiento de los desperdicios (Figura 18).



Figura 18. Punto P3 ubicado en los límites de la reserva ecológica la Cueva

Punto 4 (P4). Ubicado en el río las Cuevas, está situado entre la delegación de SEFOA y la zona designada por esta dependencia para la prueba de agroquímicos, así como de nuevos cultivos para los cuales se requieren características controladas, estos campos de cultivo cuentan con un altitud que permite por medio escorrentía que las sustancias ahí utilizadas puedan llegar al río, es importante señalar que en esta sección se pudo ver un mayor crecimiento de la vegetación entre la cual se observan atrapados una gran cantidad de residuos sólidos.



Figura 19. Punto de muestreo P4, ubicado a un costado de la zona de prueba de agroquímicos

Punto 5 (P5). Se ubica sobre el caudal del río Zahuapan principal corriente hidrológica del Estado antes de la confluencia del río Las Cuevas con éste, en este punto se observó disminución de la cobertura vegetal así como de residuos de árboles secos y ramas que en conjunto mantienen en condiciones de deterioro a esta zona, el punto está ubicado cerca de un puente automovilístico cuya construcción tiene una pendiente con caída pronunciada de aproximadamente 3 m la cual permite el movimiento acelerado de la corriente de agua desprendiendo olores desagradables y favoreciendo la formación de una capa gruesa de espuma de color blanquecino (Figura 20).

Punto 6 (P6). Está situado en el río Zahuapan después de la confluencia del río Las Cuevas, cerca de este punto se identificaron drenaje vertidos directamente al caudal, así como vegetación abundante que permite la acumulación de residuos sólidos urbanos que pueden ser arrastrados por la corriente (Figura 20).

En ambos puntos (P5 y P6) se observa la presencia de fauna doméstica que van a tomar agua y pastar a la orilla del río, así como silvestre tal es el caso de roedores, lombrices y aves de diferentes especies, entre otros, la presencia de desperdicios sólidos urbanos se vio nuevamente en aumento no solo en la orilla sino también en el centro del río (Figura 20). Estos puntos se tomaron con la finalidad de conocer si existe algún nivel de aportación de

sustancias provenientes del río Las Cuevas que puedan incrementar la ecotoxicidad del agua y sedimento de este cuerpo de agua, o bien si realiza una dilución de lo que éste lleva.



Figura 20. Imágenes representativas de los puntos P5 y P6 ambos en el río Zahuapan

3.3. Análisis fisicoquímicos del agua.

En la Tabla 1 se presentan los resultados de pH, temperatura (T), conductividad electrolítica (CE), sólidos disueltos totales (SDT) oxígeno disuelto (OD), demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅), cloruros, dureza, alcalinidad total y turbidez determinados a las muestras

de agua de la reserva ecológica Las Cuevas, así como la del grifo del LTyQA del CIGyA la cual fue utilizada como control negativo (CN) en el estudio *in vivo*.

El agua del CN presentó un pH de 8.5 ± 0.1 lo cual indica que es alcalina, mientras que en las muestras de la reserva los valores oscilaron entre 7.13 y 9.15, estos permiten clasificar a los puntos P1 y P2 como alcalinos y al P3 y P4 como neutros, el P5 (pH=6.39) y P6 (pH=7.25) correspondientes al antes y después de la confluencia del río las Cuevas con el Zahuapan fueron clasificados como ligeramente ácido y básico respectivamente. Con respecto a la temperatura en general se mantuvo en 19 °C, ambos parámetros (pH y T) se ubican dentro de los niveles máximos permitidos en los criterios ecológicos de calidad del agua para protección de vida acuática (CE-CCA-001-89).

Con respecto a la CE los resultados oscilan entre 0.267 hasta 0.796 mS/cm, el valor mínimo corresponde al CN, en términos generales se observa un incremento con respecto a la dirección del caudal del río siendo el P4 hasta 3 veces mayor que el P1, aun cuando se nota el incremento en las concentraciones de sales todos los valores están por abajo de lo establecido en los CE-CCA-001-89 para riego agrícola (1.0 mS/cm), La concentración mayor de SDT se encontró en el P5, los resultados evidencian el efecto dilución por parte del río las Cuevas ya que en el P6 después de su confluencia el valor disminuye hasta un 30 %.

El OD fluctuó entre 3.48 y 5.61 mg/l, siendo mayor nuevamente en el P5, aun así los valores se encuentran dentro del nivel permitido para protección de vida acuática, lo cual indica que el sitio si puede utilizarse como área para la conservación de la biodiversidad (CE-CCA-00/89). La DBO₅ indica la cantidad de materia orgánica biodegradable, se utiliza para medir la calidad del agua, en este sentido los puntos P1 al P4 con valores entre 30 a 120 mg/l se consideran contaminados por descargas de agua residuales de origen municipal, mientras que

el P5 y P6 correspondientes al río Zahuapan están fuertemente contaminadas por descargas de aguas residuales crudas municipales y no municipales (CONAGUA, 2018).

La dureza representa una medida de la cantidad de metales en el agua principalmente Ca y Mg provenientes de la disolución de rocas y minerales, de acuerdo a la concentración que presentan solo el CN (41.3 mg/l) se clasifica como agua blanda (<60 mg/l), en el resto de las muestras dado que la concentración oscila entre 176 y 324 mg/l se identifican como aguas de moderadamente duras a duras, el P2 es el que presenta el valor más alto, éste pudiera estar relacionado con el origen del agua (Solís-Castro *et al.*, 2018). Los puntos P1 y P2 con respecto a dureza (300 mg/l), así como todas las muestras con respecto a alcalinidad (100 mg/l) presentan valores por arriba de los límites permisibles para cultivo de carpas mencionado en la CE-CCA-00/89.

En cuanto a la concentración de cloruros el P1 presenta la concentración más baja (9.5 mg/l), la cual se fue incrementando con respecto a la corriente del río, hasta 4 veces en el punto P5 y P6 con respecto al inicial aun con este incremento todas las muestras se encuentran por abajo de los criterios ecológicos para protección de vida acuática, además según Timmons *et al.*, 2007 los puntos P1, P2, así como el CN presentan concentraciones aptas para el cultivo de peces (8 a 12 mg/L Cl⁻)

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua utilizadas en el estudio

Parámetros	VR	CN	P2 <i>in situ</i>	P1	P2	P3	P4	P5	P6
pH	5 - 9(a)	8.5±0.14	9.15±0.08	8.42±0.21	8.44±0.67	7.13±0.57	7.24±0.62	6.39±0.20	7.25±0.63
T (°C)	T amb ± 1.5 (a)	19.07	19.23	19.06	19.45	19.55	19.64	17.92	19.51
CE (mS/cm)	1.0 (c)	0.267±0.19	0.296	0.268±0.02	0.256±0.03	0.382±0.04	0.741±0.11	0.796±0.01	0.599±0.03
SDT (ppm)	500(c)	117	118	104	184	136	132	624	436
OD (mg/l)	5(a)	4.8±0.12	3.48±0.26	4.59±0.50	3.84±0.54	4.62±0.52	4.64±0.47	4.78±0.06	5.61±0.39
DBO ₅ (mg/l)		-	100	45	105	90	55	350	170
Cloruros (mg/l)	250 (a)	10.75±0.08	14.1±0.12	9.5±0.05	11.3±0.10	28.7±0.56	33.7±0.76	40.2±1.20	44.7±0.33
Dureza (mg/l)	300 (b)	41.3±0.31	324.3±0.25	305.0±0.45	307.0±1.23	195.0±0.60	215.0±1.47	176.0±0.69	224 ± 0.31
Alcalinidad (mg/l)	100 (b)	388.0±0.53	387.0±0.81	312.0±1.47	308.0±1.65	194.0±0.89	220.0± 0.17	334.0± .017	276.7± 1.04
Turbidez (ntu)		0.56	8.37	0.97	9.39	15.5	15.5	45.3	39.6

T Temperatura; CE Conductividad eléctrica; SDT Sólidos disueltos totales; OD: Oxígeno disuelto; DBO₅: Demanda bioquímica de oxígeno; CN Control negativo

VR: Valores de referencia

(a) CE-CCA-001/89. Nivel máximo en Criterios Ecológicos de Calidad del Agua para protección de vida acuática

(b) CE-CCA-001/89. Nivel máximo en Criterios ecológicos de Calidad del Agua para cultivo de carpa

(c) CE-CCA-001/89. Nivel máximo en Criterios ecológicos de Calidad del Agua para riego agrícola

(

3.4. Análisis fisicoquímico de sedimento

Las características de pH, porcentaje de materia orgánica (MO) y clase textural determinadas a las muestras de sedimento del ANP las Cuevas según la norma oficial mexicana (NOM-021-SEMARNAT-2000) se presentan en la Tabla 2. Los sedimentos muestran valores desde 6.39 ± 0.02 hasta 8.39 ± 0.04 clasificando al P1 y P2 como moderadamente alcalino, al P3, P4 y P6 como neutros y solo el P5 ligeramente ácido. Los resultados obtenidos con respecto al porcentaje de MO todas las muestras estuvieron por debajo de 1.64 % siendo el P6 quien presentó el valor más bajo (0.22 %), considerando que el Estado se encuentra en la región donde el origen de los suelos son de tipo volcánicos estos resultados los clasifica de bajo a muy bajo contenido de este parámetro, lo cual además se ve reflejado en la clase textural ya que en su totalidad son franco arenosos (NOM-021-SEMARNAT-2000). Estos valores pueden estar inversamente relacionados con la unión de los caudales de los dos cuerpos de agua tal y como sucede con los resultados de pH ya que se estabiliza justo después de la confluencia subiendo de 6.39 a un 7.25.

Tabla 2. Valores de pH, materia orgánica y textura de sedimentos superficiales de la reserva ecológica las Cuevas

Sitio	pH	MO (%)	Textura
P1	^L 8.39 ± 0.04	^B 1.03	Franco arenoso
P2	^L 7.84 ± 0.02	^B 0.92	Franco arenoso
P3	^N 7.13 ± 0.02	^B 1.64	Franco arenoso
P4	^N 7.24 ± 0.02	^B 1.37	Franco arenoso
P5	^A 6.39 ± 0.02	^B 0.63	Franco arenoso
P6	^N 7.25 ± 0.02	^M 0.22	Franco arenoso

M.O: Porcentaje de materia orgánica.

NOM-021-SEMARNAT-2000

^A Moderadamente ácido,

^N Neutro,

^L Moderadamente alcalino

^B Bajo,

^M Muy bajo

3.4 Cuantificación de elementos potencialmente tóxicos (EPTs) y como cociente de peligro (CP) en muestras de la RE la Cueva

3.4.1. EPTs y CP en Agua

En la Tabla 3 se presentan las concentraciones de EPTs cuantificados en las muestras de agua, así como el CP mismo que se determinó con base en la normatividad nacional (CE-CCA-001/89) considerando los niveles de protección de vida acuática y riego agrícola, es importante destacar que solo para este parámetro se realizaron dos muestreos para ambas matrices. De los elementos cuantificados en el primer muestreo se pudieron identificar concentraciones que oscilan entre 0.16 y 0.19 µg/ml para CrT, con respecto al Mn el P5 presentó un valor 5 veces más alto con respecto al P1, sin embargo solo los valores del Al se ubicaron por arriba de los CE-CCA-001/089 para protección de vida acuática, señalándolo además como un elemento de riesgo debido a que presentó un CP hasta de 414.6 en el P3 y de 792.8 en el P5 cabe destacar que estos puntos se están ubicados después de una descarga de descargas de origen urbano e industrial y en el río Zahuapan respectivamente. Para el segundo muestreo la concentración de CrT y Mn disminuyó y solo se detectó en 2 de las 6 muestras, el Ni se encontró en 4 de las 6 muestras sin embargo no representa riesgo ya que el CP arroja valores muy por abajo de la unidad.

3.4.2. Cuantificación de EPTS en sedimento y determinación de CP, FE e IGeo

La tabla 4 muestra los resultados obtenidos de EPTs en las muestras de sedimento, de los dos muestreos (enero y junio). Referente al primero se observa que solo en el P2 se detectó CrT, Mn y Al en concentraciones de 29.8, 2.40 y 2106 µg/g respectivamente estos valores están por abajo del límite establecido por la LEL-NJDEP. Para el segundo el Mn y el Fe se cuantificaron en las 6 muestras, mientras que el Ni solo se identificó en la P1 y P3 sin presentar diferencias entre puntos

y con niveles por debajo de la normatividad internacional. El CP del Al en el P2 se acerca ligeramente a la unidad sin representar un riesgo real.

Tabla 3. Concentración de elementos potencialmente tóxicos (µg/ml) y cociente de peligro en agua de los diferentes puntos de la reserva ecológica las Cuevas

	EPTs	CE-CCA-001/89	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Primer muestreo	Pb		ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Cd		ND	ND	ND	ND	ND	ND
	CrT	-	0.18	0.16	0.16	0.17	0.18	0.19
	Mn	-	0.28	0.27	0.51	0.32	1.35	0.35
	Al	0.05 *	11.89	10.89	20.73	14.74	39.64	16.91
	CP-Al	0.05 *	237.8	217.8	414.6	294.9	792.8	338.2
		5.00**	2.37	2.17	4.1	2.94	7.92	3.38
Segundo muestreo	Pb		ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Cd		ND	ND	ND	ND	ND	ND
	CrT		0.05	ND	ND	0.86	ND	ND
	Mn		ND	ND	ND	ND	0.11	0.13
	Fe	1.0 *	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Ni	0.2 **	0.03	ND	ND	0.02	0.03	0.05
	CP-Ni	0.2 **	0.15	ND	ND	0.1	0.15	0.25

* CE-CCA-001/89. Nivel máximo en Criterios Ecológicos de Calidad del Agua para protección de vida acuática

** CE-CCA-001/89. Nivel máximo en Criterios ecológicos de Calidad del Agua para riego agrícola

ND = no detectable

CP 0 Cociente de peligro

El FE e Igeo se obtuvieron para identificar la procedencia de los EPTs que se cuantificaron en las muestras de sedimento, el FE indica si los elementos se derivan de la roca madre o de otra fuente de enriquecimiento, mientras que el Igeo se utiliza para evaluar cuantitativamente la contaminación de los sedimentos a través de la concentración de metales frente a los valores de referencia. Al respecto se concluye que los elementos cuantificados provienen de la roca madre

y por lo tanto no contribuyen con la contaminación en los puntos de muestreo analizados (tabla 5).

Tabla 4. Concentración de EPTs (µg/g) y CP en sedimento superficial de los sitios de la Reserva ecológica las Cuevas

	EPTs	LEL-NJDEP	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Primer muestreo	Pb		ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Cd		ND	ND	ND	ND	ND	ND
	CrT	26*	ND	29.8	ND	ND	ND	ND
	CP-CrT			1.1				
	Mn	630 *	ND	2.40	ND	ND	ND	ND
	Al	2550 *	ND	2106	ND	ND	ND	ND
	CP-Al			0.82				
Segundo Muestreo	Pb		ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Cd		ND	ND	ND	ND	ND	ND
	CrT		ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Mn	630 *	26.04	1.22	28.42	23.52	5.98	22.73
	Fe		1062	916	915	975	757	1086
	Ni	16	9.67	ND	4.78	ND	ND	ND
	CP-Ni	16	0.60		0.29			

ND: no detectable

EPTs elementos potencialmente tóxicos

Pb: plomo, Cd: cadmio, CrT: cromo total, Mn: manganeso, Al: aluminio, Fe: hierro, Ni: níquel.

* LEL-NJDEP, nivel de mínimo efecto para criterios ecológicos del Departamento de protección ambiental de Nueva Jersey

Tabla 5. Factor de enriquecimiento e índice de geoacumulación en muestras de sedimento de la RE La Cueva

FE								Igeo
	EPTs	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P2
Primer muestreo	CrT		1.0					0.77
	Mn		0.1					
Segundo muestreo	Mn	1.3	0.1	1.6	1.2	0.4	1.1	
	Al		1.0					
	Ni	1.2		0.7				

ND: no detectable Pb: plomo, Cd: cadmio, CrT: cromo total, Mn: manganeso, Al: aluminio, Fe: hierro, Ni: níquel

3.5. Parámetros morfométricos de *C. carpio* *in situ* e *in vivo*

El tratamiento *in situ* se realizó con peces de la especie *C. carpio* (carpa común) criados en el humedal artificial correspondiente al P2 del ANP las Cuevas se obtuvo una n=22, los organismos se dividieron en 2 grupos el primero con n=15 considerado grupo expuesto se procesó inmediatamente después de su captura, el segundo n=7 se sometió a un proceso de desintoxicación para considerarse como control negativo. En el tratamiento *in vivo* se utilizaron peces provenientes de un criadero, después del proceso de aclimatación se expusieron a las muestras de agua recolectadas de los diferentes puntos de la RE las Cuevas descritos anteriormente.

Tabla 6. Medidas morfométricas y factor de condición de carpas (*C. carpio*) después de la exposición *in situ* e *in vivo*

Tratamiento		n	Peso (g)	Largo total (cm)	Factor de Fulton
			Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
<i>in situ</i>	Expuestos	15	64.21 $\pm$ 17.63	16.83 $\pm$ 1.53	1.40 $\pm$ 0.18
	Controles	7	46.28 $\pm$ 19.36	15.55 $\pm$ 1.98	1.15 $\pm$ 0.20
<i>in vivo</i>	P1	4	11.00 $\pm$ 4.54	9.32 $\pm$ 1.38	1.33 $\pm$ 0.36
	P2	6	11.16 $\pm$ 5.34	9.80 $\pm$ 1.89	1.09 $\pm$ 0.10
	P3		12.20 $\pm$ 6.91	9.42 $\pm$ 1.73	1.33 $\pm$ 0.15
	P4	5	9.60 $\pm$ 3.44	9.60 $\pm$ 1.25	1.06 $\pm$ 0.18
	P5	5	8.17 $\pm$ 2.14	9.06 $\pm$ 0.81	1.08 $\pm$ 0.15
	P6	5	11.60 $\pm$ 4.39	9.22 $\pm$ 0.85	1.28 $\pm$ 0.27
	Control negativo (CN)	5	8.80 $\pm$ 1.92	8.98 $\pm$ 1.06	1.50 $\pm$ 0.12
	Control positivo (CP)	5	7.01 $\pm$ 0.71	6.10 $\pm$ 0.64	1.10 $\pm$ 0.17
Valor de Fulton					1-3

Todos los organismos después del tratamiento correspondiente se procesaron para realizar la evaluación de los efectos. Previo al sacrificio los peces fueron pesado y medidos con el fin de obtener sus medidas morfométricas y determinar el factor de condición. Los organismos de la exposición *in situ* presentaron peso promedio entre 40 y 60 g con una talla de 15 a 16 cm, mientras que los del tratamiento *in vivo* el peso oscilo entre 7 y 12 g y la talla en promedio fue de 9 cm, en general todos los grupos presentaron un valor de condición de Fulton superior a 1 evidenciando que tuvieron un crecimiento libre de estrés (Tabla 6) y poseen un buen estado de salud.

3.5 Cuantificación de EPTs en tejido muscular de *C. carpio* capturadas en la RE la Cueva

En la Tablas 7 se observan los resultados de los EPTs analizados en tejido muscular de *C. carpio* capturados en el punto 2 correspondiente al humedal (*in situ*) de la reserva ecológica Las Cuevas. Las concentraciones de los elementos cuantificados fueron en el orden de Al>Fe> CrT>Ni en el grupo expuesto mientras que Fe> CrT para el control.

Tabla 7. Promedio de las concentraciones de EPTs (mg/kg) en tejido muscular de *C. carpio* después de la exposición *in situ*

EPTs	CONTROL	EXPUESTOS
Pb	ND	ND
Cd	ND	ND
CrT	5.2 + 1.94	12.36 + 10.14
Mn	ND	ND
Al	ND	83.56 +6.04
Fe	28.37 + 9.61	28.05 + 9.61
Ni	ND	2.75 + 1.60

Tratamiento	n	Pb	Cd	Cr _T	Mn	Fe	Ni	Al
Expuestos	15	ND	ND	2.84±2.98	ND	24.05±13.49	1.96± 1.63	35.81 ±43.07

Control	7	ND	ND	ND	ND	8.10 + 14.29	ND	ND
---------	---	----	----	----	----	--------------	----	----

3.6. Evaluación genotóxica del agua de la RE a través del ensayo de MN en *C.*

Carpio

En la figura 21 se muestran los resultados de la evaluación del efecto al DNA por ensayo de MN en eritrocitos de sangre periférica de peces capturados *in situ* en el humedal dentro de la RE las Cuevas. Los organismos considerados expuestos (n=15) presentaron una frecuencia promedio de 8.06 ± 2.4 MN/1000 células, dos veces mayor que el valor obtenido para los organismos que se sometieron al proceso de desintoxicación, los cuales presentaron un valor medio de 3.7 ± 2.5 MN/1000 CT. El objetivo de someter a estos organismos a desintoxicación fue evidenciar una disminución del daño de tal manera que los resultados permitieran considerarlo como control negativo.

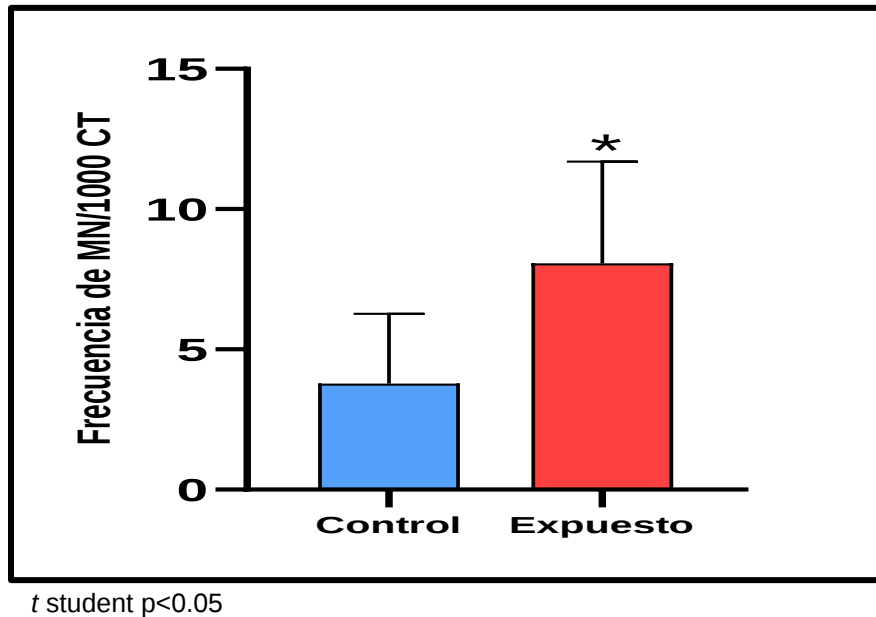


Figura 21. Promedio de la frecuencia de MN en eritrocitos de *C. carpio* capturadas *in situ* en el P2 de la RE Las Cuevas

Con el ensayo de MN además se pueden analizar otro tipo de efectos tal es el caso de las anormalidades nucleares (AN), de esta manera se obtuvo el promedio de la frecuencia de células globuladas (7.1 ± 3.75 GB/1000 CT) y células con muescas (5.8 ± 3.22 MU/1000 CT), los resultados fueron estadísticamente diferentes al control (2.4 ± 1.32 GB/1000 CT y 1.8 ± 1.55 MU/1000 CT).

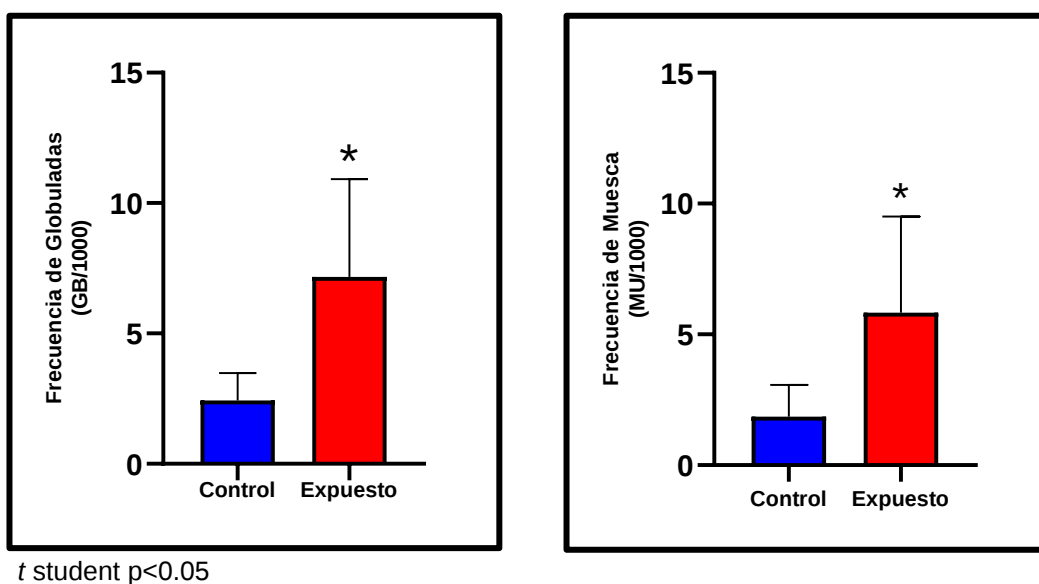
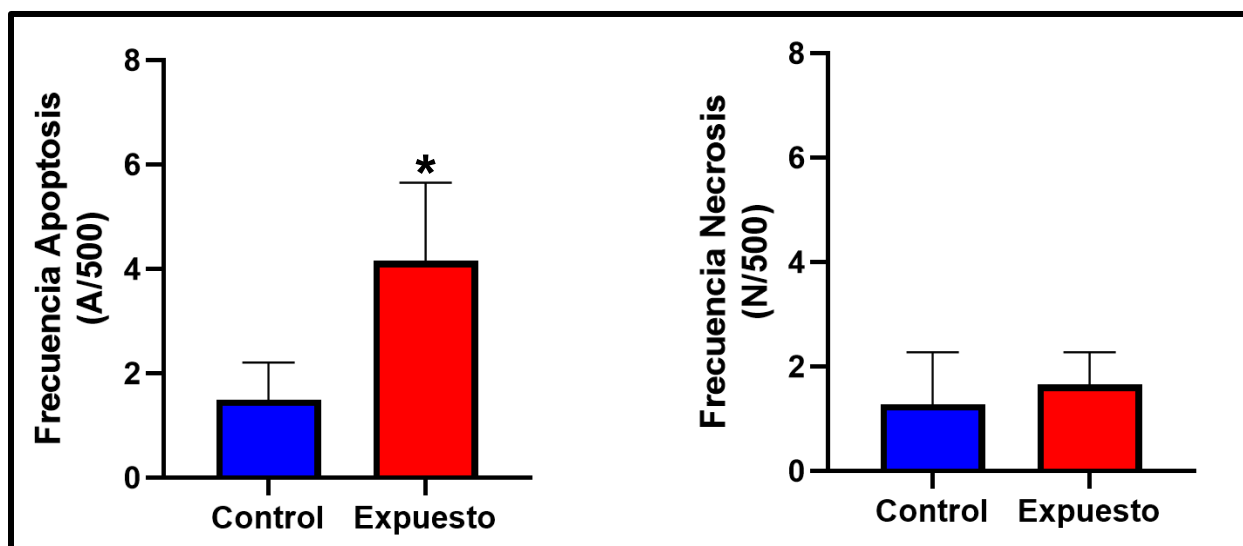


Figura 22. Valor medio de la frecuencia de células globuladas (GB) y con muesca (MU) en eritrocitos de *C. carpio* después de la exposición *in situ* en el agua de la RE Las Cuevas.

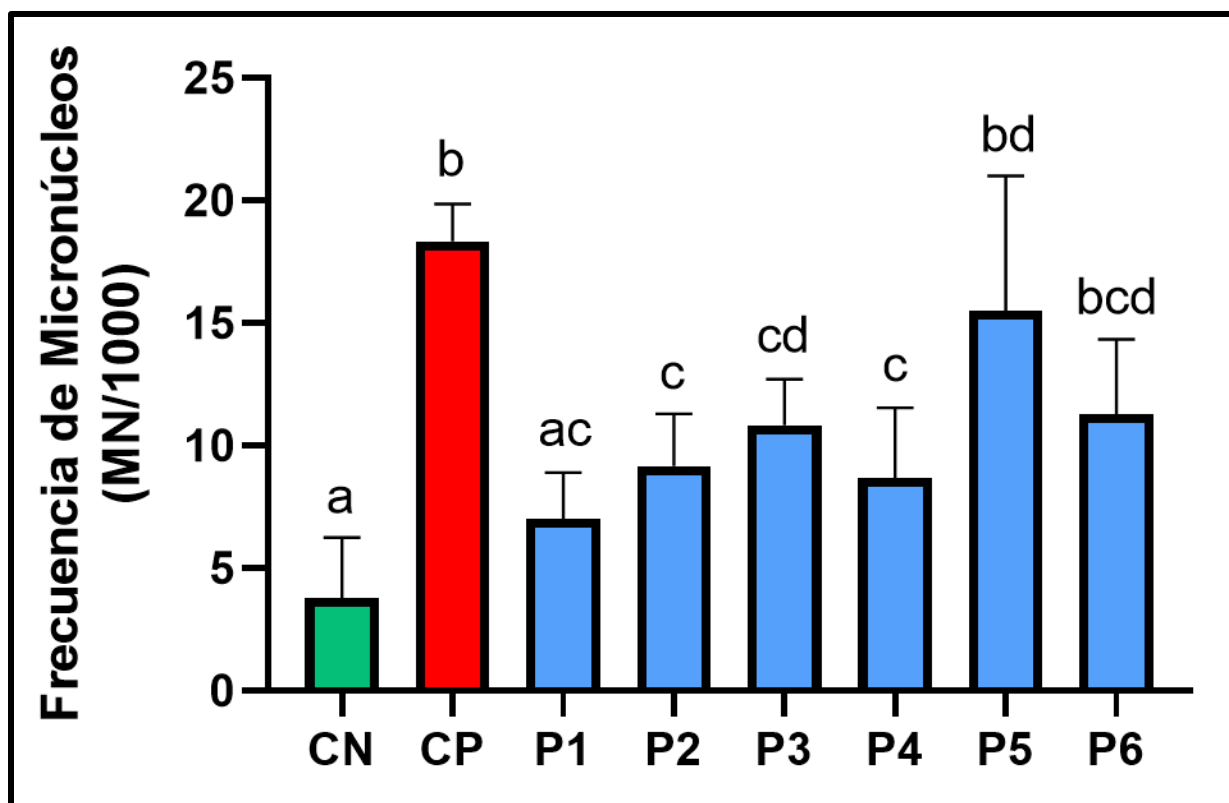
Para evaluar la presencia de sustancias con capacidad citotóxica se evaluaron células en apoptosis y necrosis (figura 23) solo las primeras (4.3 ± 2.55 CA/500 CT) presentan un incremento significativo con respecto al control (1.69 ± 1.44 A/500 CT), demostrando la capacidad citotóxica de este ambiente acuático.



t student $p < 0.05$

Figura 23. Valor medio de la frecuencia de células en apoptosis y necrosis en eritrocitos de *C. carpio* después de la exposición *in situ* al agua de la RE Las Cuevas.

La Figura 24 muestra los resultados obtenidos de frecuencia de MN en eritrocitos de *C. carpio* después de la exposición *in vivo* a muestras de agua de los diferentes puntos ubicados en el área de la reserva ecológica Las Cuevas además del control negativo para el cual se utilizó agua potable del LTyQA del CIGyA y el positivo con una concentración de (dicromato de potasio). El promedio de la frecuencia de micronúcleos muestra un incremento directamente proporcional a la dirección de la corriente del río principal donde confluyen todos los cuerpos de agua de la RE, mostrando diferencias significativas con respecto al control (3.7) a partir del P2 (9.1) se observa además que en el punto P6 (11.3) se presenta una ligera disminución del efecto con respecto al punto P5 (15.5) ambos ubicados sobre el cauce del río Zahuapan, esto podría deberse a que el agua proveniente de la RE Las Cuevas está generando un efecto de dilución de los contaminantes que el Zahuapan arrastra.



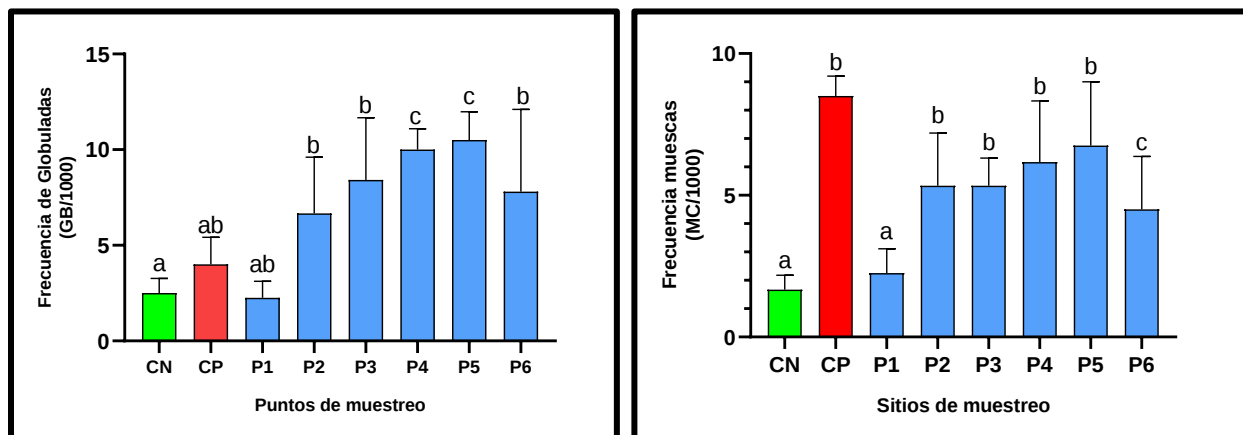
CN: Control negativo; CP: Control positivo; P1-P4 Puntos de la RE Las Cuevas; P5 y P6 Puntos sobre el cauce del río Zahuapan
ANOVA y Dunnet $p < 0.05$. Letras iguales no hay diferencia significativa

Figura 24. Media de la frecuencia de MN en eritrocitos de *C. carpio* después de la exposición *in vivo* al agua de diferentes puntos de la RE Las Cuevas.

En la figura 25 se muestran los resultados de anomalías nucleares de los peces del experimento *in vivo*, se observa un incremento significativo para ambos parámetros a partir del punto P2 hasta el P6 con respecto al CN, los resultados además fueron incrementándose con respecto a la corriente del río, los puntos P4 y P5 para las lobuladas, incluso presentaron valores más altos que el CP, mientras que con las de muestra del P2 al P5 presentaron valores similares.

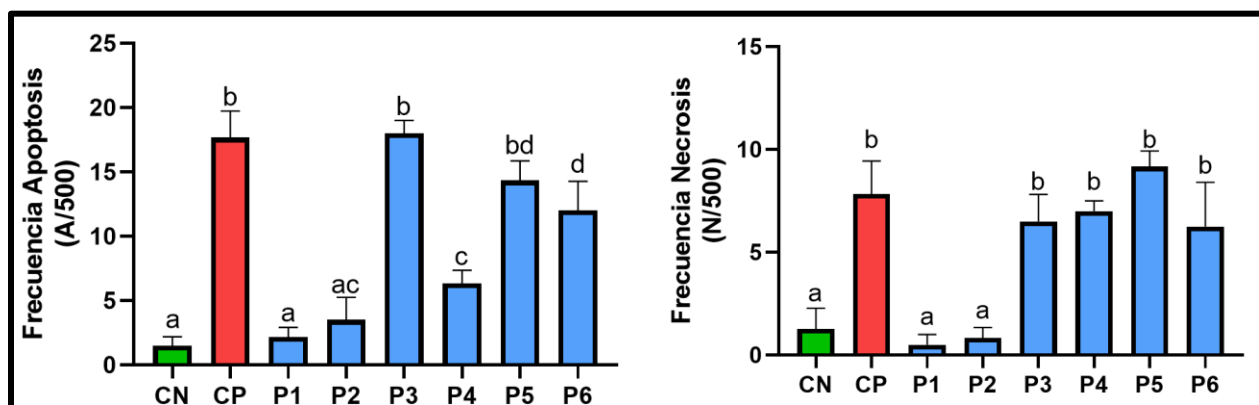
Con respecto a las células en apoptosis y necrosis igual se observa un incremento significativo con respecto al CN desde el P3 hasta el P6, también con valores similares al CP (Figura 26).

En general en todos los análisis realizados se observa un pequeño decremento de los efectos en el punto P6 lo cual sugiere un efecto dilución de los contaminantes del río Zahuapan después de la confluencia del río Las Cuevas.



CN: Control negativo; CP: Control positivo; P1-P4 Puntos de la RE Las Cuevas; P5 y P6 Puntos sobre el cauce del río Zahuapan
ANOVA y Dunnet $p < 0.05$. Letras iguales no hay diferencia significativa

Figura 23. Promedio de la frecuencia de células globuladas (GB) y con muesca (MU) en eritrocitos de *Cyprinus carpio* después de la exposición in vivo al agua de los diferentes puntos RE Las cuevas.

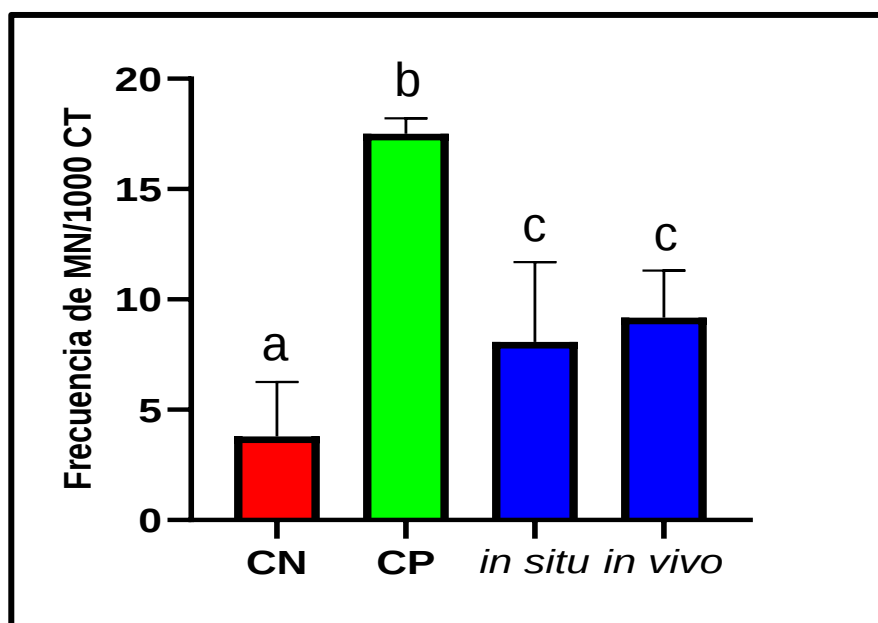


CN: Control negativo; CP: Control positivo; P1-P4 Puntos de la RE Las Cuevas; P5 y P6 Puntos sobre el cauce del río Zahuapan
ANOVA y Dunnet $p < 0.05$
Letras iguales no hay diferencia significativa

Figura 26. Media de la frecuencia de células en apoptosis y necrosis de eritrocitos de *C. carpio* después de la exposición in vivo al agua de los diferentes puntos RE Las cuevas.

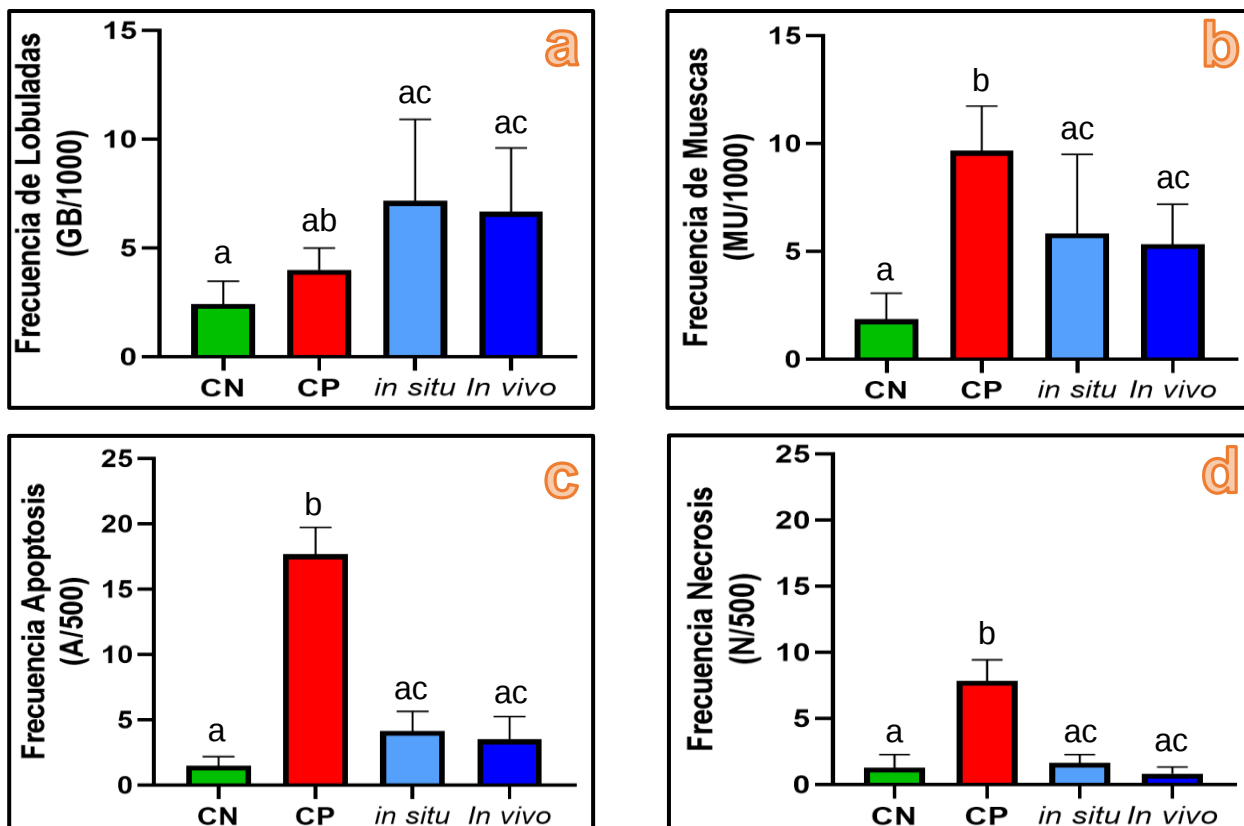
En la Figura 27, 28 se comparan los resultados obtenidos del experimento *in situ* con el *in vivo* del P2 correspondiente al humedal tanto del experimento *in situ* como *in vivo*. Los resultados demuestran un incremento en la frecuencia de MN de ambos experimentos con respecto al CN, pero no entre experimentos (Figura 27), un comportamiento similar sucede con

el promedio de la frecuencia de anomalías nucleares éstas son estadísticamente significativas con respecto al CN, no así para el efecto citotóxico (figura 28).



CN: Control negativo; CP: Control positivo; P1-P4 Puntos de la RE Las Cuevas; P5 y P6 Puntos sobre el cauce del río Zahuapan ANOVA y Dunnet $p < 0.05$ Letras iguales no hay diferencia significativa

Figura 24. Comparación de la frecuencia de MN obtenida en eritrocitos de *C. carpio* después de los experimentos *in vivo* e *in situ* del punto 2 de la RE La Cuevas



CN: Control negativo; CP: Control positivo; P1-P4 Puntos de la RE Las Cuevas; P5 y P6 Puntos sobre el cauce del río Zahuapan ANOVA y Dunnett $p < 0.05$. Letras iguales no hay diferencia significativa

Figura 258. Comparación de la frecuencia de anomalías nucleares: a) Células lobuladas, b) Células con muescas; así como efectos citotóxicos: c) Células en apoptosis y d) Células en necrosis; en eritrocitos de *C. carpio* después de los experimentos *in vivo* e *in situ* del punto 2 de la RE La Cuevas

3.7. Evaluación genotóxica del agua de la RE a través del ensayo cometa en *C. carpio*

En la Tabla 7 y Figura 29 se muestran los resultados de la evaluación de la genotoxicidad por ensayo cometa en peces de la especie *C. carpio* después de la exposición *in vivo* al agua de los diferentes puntos de la reserva ecológica la Cueva. Con respecto al porcentaje de moléculas que presentaron fragmentación este valor se incrementó directamente proporcional con respecto al recorrido del río hasta 4 veces en los puntos del ANP las Cuevas y hasta diez veces en los puntos del río Zahuapan las moléculas de clase 0 fueron las que se presentaron en mayor proporción,

solo el testigo positivo, así como el P5 y P6 solo mostraron moléculas de clase 3. en el punto parámetro de observar los resultados de la fragmentación en moléculas de ADN de eritrocitos de peces generada por la exposición *in vivo* al agua del río y la reserva ecológica las cuevas. Las moléculas de ADN con los diferentes niveles de daño se incrementaron significativamente con respecto al control negativo a excepción del punto P1(6.67 ± 1.53) en donde se aprecian valores similares al CN (6.33 ± 0.58), la case 1 y 2 las que presentaron mayor porcentaje, destacando que en el punto RC5 se encuentra el nivel más alto de daño inclusive superando al nivel CP con valores de 60.00 ± 22.52 y 33.51 ± 5.69 respectivamente, las moléculas con clase de daño 3 se presentaron en menor porcentaje.

Por otro lado, se puede apreciar el incremento en el daño a los eritrocitos de esta especie conforme se continua el recorrido del cauce de este río con valores que van desde 6.67 ± 1.53 en el P1 hasta el P5 60.00 ± 22.52 disminuyendo en el punto P6 con un valor de 29.40 ± 10.72

Tabla 7. Clasificación de moléculas de DNA de eritrocitos de *C. carpio* después de la exposición *in situ* e *in vivo* a muestras de agua de diferentes puntos de la RE Las Cuevas

Exposicion	Clase			
	0	1	2	3
<i>in situ</i>	86.40±4.51	10.80±3.11	0.80± 1.10	0
P 1	93.33±1.53	6.67±1.53	0	0
P 2	89.88±1.65	9.75±1.19	0.38±0.75	0
P 3	81.83±4.73	14.83±4.01	3.33±1.26	0
P 4	81.63±1.89	14.25±1.66	4.13±1.18	0
P 5	58.13±8.81	25.25±4.01	15.75±6.99	1.13±0.85
P 6	76.10±6.90	17.90±5.59	5.40±1.82	0.60±0.55
TN	93.75±0.35	6.25±0.35	0	0
TP	77.00±4.58	15.67±4.04	5.67±1.15	1.67±0.58

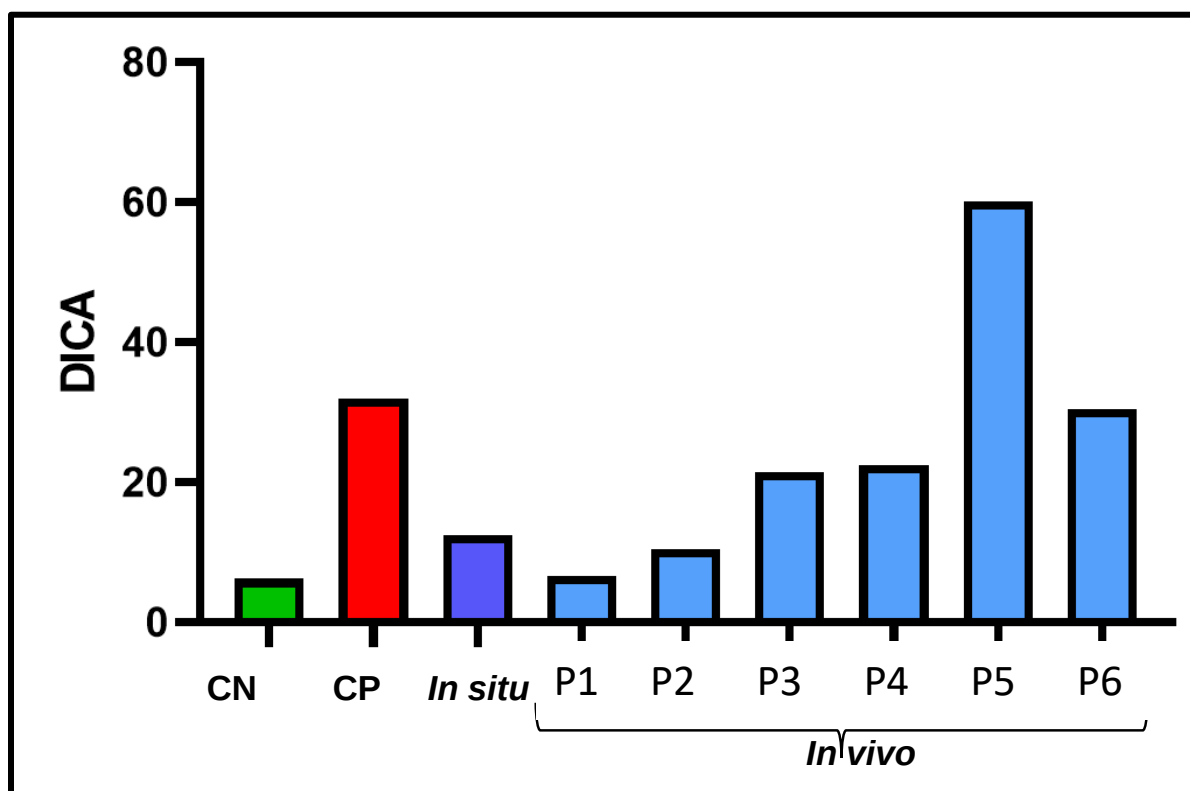


Figura 26. Índice de daño al ADN (DICA) en eritrocitos de *C. carpio* después de la exposición *in situ* e *in vivo* a muestras de agua de diferentes puntos de la RE Las Cuevas

4. DISCUSIÓN

Muchos ecosistemas acuáticos continentales como, ríos, lagos y humedales naturales o artificiales dependen directa e indirectamente de los acuíferos subterráneos. Los ecosistemas acuáticos contienen una gran variedad de organismos y las relaciones e interacciones entre ellos permiten mantener un equilibrio estricto que puede ser traducido en una biodiversidad particular o específica de un entorno determinado, influenciada por los factores químicos y físicos que el medio les facilite (Laws 1981).

En términos de la calidad de agua es necesario para cualquier tipo de investigación en el que se utilice esta matriz, saber qué aspectos están íntimamente relacionados con capacidad de retención de nutrientes y la autodepuración es bien sabido que estos disminuyen con el caudal en cuerpos de agua superficiales en condiciones naturales (Butturini y Sabater 1998) y que aquellos cauces que presentan ciertos niveles de contaminación tienden a apartarse de esa relación (Martí et al. 2004); no obstante, quedan muchos aspectos importantes por discernir sobre cómo es la calidad del agua respecto a la interacción entre caudal, temperatura, carga de nutrientes y usos del territorio cercanos a estos cuerpos de agua recurriendo a la aplicación de una parametrización que permita deducir y predecir algunas de las posibles formas de movilidad de contaminantes específicos en el estudio *in situ* los parámetros físico-químicos, así como las concentraciones de metales (Pb, Cr, Cd y Ni) no rebasaron los límites permisibles de contaminantes básicos para la protección de la vida acuática, mencionados en la NOM-001-ECOL-1996.

Al respecto, es posible ver las diferencias en las características físicas y químicas entre el agua del río las Cuevas y el agua que se encuentra en sus inicios, estas podrían estar determinadas por el caudal y la época en la que se desarrolló el estudio, grado de antropización, características orográficas y geológica de la zona. En este sentido, el pH (Tabla 1) observado osciló desde alcalino hasta ligeramente ácido, la alcalinidad podría deberse a la presencia de iones de carbonato e hidróxido que pueden provenir de los minerales naturales solubles ya

que el P2 donde la concentración es más alta corresponde humedal el cual está formado por el flujo de los diferentes manantiales de la zona, tanto las concentraciones de alcalinidad, como la conductividad, se fueron incrementando conforme se acercaba a la desembocadura, esto también pudiera estar relacionado con la presencia de actividades antrópicas observadas durante las visitas al sitio, esto respaldado por la disminución de algunas propiedades como la dureza ya que es bien sabido que la mineralización del agua en los sistemas con corrientes naturales, está principalmente determinada por el clima y la geología del terreno (Allan 1995, Wetzel 2001, Toro *et al.*, 2002; Solís-Castro *et al.*, 2018), en este caso por la longitud y extensión del afluente la variación de estas propiedades debería de ser mínimas.

Con respecto a la DBO₅ se observó variabilidad en los valores encontrados a lo largo del cauce del río Las Cuevas, siendo el más alto el del río Zahuapan y aunque este parámetro no tiene un valor normativo según la CONAGUA, las concentraciones encontradas en los puntos P1 al P4 las clasifica como contaminadas principalmente por aguas residuales de tipo doméstico por otra parte debe considerarse que el incremento de esta variable puede ocasionar la disminución en la cantidad de oxígeno disuelto en el agua, alterando la calidad de vida en los ecosistemas acuáticos (CONAGUA, 2018).

Los resultados de pH, CE y T son similares a los reportados para otro ecosistema acuáticos del estado donde su fuente de abastecimiento también es un manantial, no así para el OD que presentó valores hasta 3 veces más alto que este estudio, caso contrario sucedió con la DBO₅ la cual se reportó con concentraciones de 4 a 9 veces mayores (García-Nieto *et al.*, 2015).

Los sedimentos naturalmente pueden contener una gran variedad de materiales desde residuos minerales y rocas hasta mezclas de proteínas, carbohidratos, lípidos y sustancias húmicas, además de sustancias contaminantes vertidas antrópicamente, estos componentes determinan de cierta manera sus propiedades físicas, químicas y biológicas, la caracterización de los sedimentos de la reserva ecológica Las cuervas al igual que lo reportado por otras

investigaciones son suelos volcánicos con poca materia orgánica y pH neutro y pueden estar relacionados con la biodisponibilidad de los contaminantes (García-Nieto et al., 2015; 2019), los contenidos de arcilla que en este caso fueron bajos evita la retención de metales, de tal manera que estos se pueden ir a la columna de agua y de esta manera exponer a la biota (Romero-Lázaro et al., 2019).

Los cuerpos de agua especialmente los ríos presentan crecientes niveles de procesos de contaminación debido a las actividades antrópicas que se desarrollan en sus alrededores. Entre las más destacadas encontramos agricultura, industria y desarrollo urbano. Estas actividades generan una gran variedad de residuos los cuales llegan por diferentes medios a estos cuerpos de agua que resultan de vital importancia para los organismos que en ellos habitan. Estos residuos contienen materiales como metales, los cuales, a diferencia de la materia orgánica que se acumula naturalmente, no sufren algún tipo de degradación natural ni química derivado de los procesos de la naturaleza, por lo general suelen ser persistentes y tienden a provocar la bioacumulación en los organismos provocando severos daños a diferentes niveles de la cadena trófica (Banks et al., 2005; Ait Alla et al., 2006; Tapia et al., 2009; Díaz-Jaramillo et al., 2010).

Para el caso de los metales analizados solo se identificó al CrT, Mn Ni y Al en agua y CrT, Mn, Ni y Fe en sedimento, de ellos solo el Al en agua y CrT en sedimento se encontraron ligeramente por arriba de normas ambientales. Aún cuando en todas las muestras se identificó CrT en agua, las concentraciones están por debajo de lo reportado por García-Nieto et al., (2015) para agua potable, sin embargo en sedimento las concentraciones de CrT (Tabla 4) fueron más altas que lo reportado para la presa de Lázaro Cárdenas y similar a un punto de la presa de Atlangatepec en el estado de Tlaxcala (González-Pozos, 2019). Si bien estas concentraciones son significativas es importante resaltar que características específicas del agua pueden afectar la cantidad de material que se puede absorber en los organismos de régimen acuático mismos que se emplearon en este trabajo, un claro ejemplo de este tipo de acontecimientos es que la alcalinidad, la dureza, el pH y la temperatura de esta matriz las cuales pueden modificar la

toxicidad de ciertos elementos como ejemplo se tiene la peculiaridad del ion hierro, mientras mayor sea el calcio y menor la acidez, menor será la toxicidad de este en la matriz agua, la presencia del ion calcio en peces está catalogado que tiende a provocar la disminución de la permeabilidad de los tejidos y a favorecer cambios en la carga del epitelio branquial lo cual en algunos casos provoca repeler algunos contaminantes (Perschbacher y Wurts 1997).

Por otra parte, el hierro es uno de los elementos catalogados como esenciales para el adecuado funcionamiento de órganos y tejidos de animales como los peces; debido a que juegan un papel primordial en lo que se refiere al transporte de oxígeno sin dejar de lado la respiración celular. Estudios como el de (Roeder y Roeder, 1996) mencionan que los peces tienen la capacidad de absorber hierro que se encuentra soluble en el agua por la membrana branquial del mismo modo sucede con la mucosa intestinal, la mayor fuente de hierro en peces suele ser el alimento ya que en aguas naturales el hierro se encuentra en bajas concentraciones (NRC,2000). Los niveles dietéticos óptimos de hierro reportado para diferentes especies van de 30 a 175 mg/kg de la dieta, la deficiencia de esta causa diferentes anomalías aumentando la susceptibilidad de los peces. (Davis y gatlin,1996).

Alteraciones como la contaminación inducen a cambios en la estructura de las comunidades que generan estas redes de biodiversidad, principalmente en la función de los sistemas acuáticos y en el organismo biológicamente hablando, afectando su ciclo de vida, crecimiento y reproducción (Bartram y Ballance 1996, Raz-Guzmán 2000).

Es así como los organismos que los habitan pueden desarrollar diferentes niveles de tolerancia a los factores bióticos y abióticos, cuya resistencia en base al paso del tiempo, les permite ser considerados como potenciales indicadores de alteración proveniente de la contaminación (Whiton 1975). Estas perturbaciones incluyen la temperatura, pH alcalino o ácido, condiciones de baja oxigenación hipoxia y anoxia, los plaguicidas, metales pesados, hidrocarburos y materia orgánica. Los grupos que son utilizados con mayor frecuencia como

bioindicadores de contaminación son las bacterias, algas, invertebrados y peces (Chapman 1996, De la Lanza *et al.* 2000, Aguilar 2005).

Considerando que los animales acuáticos se encuentran en exposición constante en forma natural a una cantidad de metales y contaminantes con diferentes concentraciones químicas determinadas por los procesos geoquímicos naturales y artificiales (antrópico) es bien sabido que para satisfacer adecuadamente sus requisitos metabólicos requieren absorber diferentes minerales de la matriz en la que se desarrollan Davis y Gatlin (1996) hacen mención que para un metabolismo adecuado los peces en especial deben de absorber por diferentes medios cerca de dieciséis elementos traza dentro de los que se encuentran aluminio, arsénico, cobalto, cobre, flúor, iodo, hierro, manganeso, molibdeno, níquel, selenio, sílice, estaño y vanadio.

Se han realizado diferentes investigaciones donde se puede apreciar que la toxicidad celular y genética *in vitro* de ciertos metales, entre ellos el aluminio, si bien es muy reconocido que este metal se encuentra de forma natural en muchos de los cuerpos de agua del planeta, su exceso se debe en gran medida al vertido de efluentes de origen doméstico y en mayor proporción de las descargas provenientes de industrias (García-Medina *et al.*, 2011) en este trabajo se evidencia el efecto del aluminio sobre las cadenas de ADN, algunos estudios mencionan como es que es material se enfoque en la modificación estructural de la cromatina mismas que pueden generar especies altamente reactivas del oxígeno entorpeciendo los procesos respiratorios de especies como *C. carpio*.

La formación de MN y de algunas variedades de anormalidades nucleares se ven favorecidas por la exposición de la cadena de ADN a metales pesados como lo son los núcleos globuladas o con muescas, tanto en condiciones *in vivo* como *in situ* (Pradipta 2012). Los niveles de anormalidades nucleares (MN, globuladas y muesca) son altos en comparación con los organismos que se tomaron como referencia así también se logra apreciar una aparente diferencia en la presencia de anormalidades nucleares los organismos expuestos comparados

con el control formado por organismos sometidos a desintoxicación aparente, esto podría indicar un posible estrés oxidativo en los organismos de dicha especie derivado de las condiciones de las matrices ambientales encontradas en la zona, consistente con los avistamientos de organismos con crecimiento anormal y la sobrepoblación del cuerpo de agua principal de la RE Las Cuevas, es importante resaltar que *C. carpio* es una especie invasora que ha colonizado exitosamente ecosistemas acuáticos dulceacuícolas y salubres expuestos a ciertos niveles de contaminación (InBuy, 2011), denotando con esto su capacidad de adaptabilidad reforzando esta idea como las condiciones la zona interna de la reserva ecológica, era esperable encontrar valores de anormalidades nucleares inferiores o no significativas, sin embargo los niveles de daño genético y celular fueron importantes para este trabajo dando por acentuado que este organismo es un excelente bioindicador cuya sensibilidad a diferentes condiciones evidencia el efecto de contaminantes.

Según los análisis realizados el agua de la reserva ecológica es susceptible de recibir contaminantes por escorrentía proveniente de las diferentes fuentes de contaminación identificadas entre ellos podrían ser algunos plaguicidas ya que se ha reportado el efecto genotóxico de éstos comúnmente empleados en la agricultura por lo que la presencia de trazas podría ser la causa de los efectos observados (Ibañez y Ángulo, 2022)

5. CONCLUSIONES

Las características fisicoquímicas encontradas en los cuerpos de agua de la reserva ecológica las Cuevas como pH, alcalinidad, dureza, materia orgánica y textural de las matrices ambientales analizadas en el sitio de estudio tienden a favorecer la movilidad y biodisponibilidad de los EPTs, en el agua además de permitir la movilidad de estos a lo largo la de corriente del río, contribuyendo a la exposición de los organismos que habitan la zona..

De acuerdo con los criterios ecológicos de la calidad del agua todos los sitios de muestreo representan un riesgo para uso agrícola y vida acuática, enfatizando la presencia de Al en concentraciones superiores a las establecidas por el departamento de protección ambiental de Nueva Jersey resaltando que el riesgo incrementa significativamente en los puntos referentes al río Zahuapan, convirtiéndolo en el contaminante crítico por rebasar los límites establecidos en los CE-CCA-001-89 y según el FE proviene de fuentes antrópicas.

Se demostró la capacidad geno y citotóxica del agua de la RE Las Cuevas en *C. carpio*, incrementando los parámetros analizados con los ensayos cometa y MN, esto aunado a la acumulación de CrT, Fe y Al en tejido muscular representado un riesgo para la biota.

La caracterización fisicoquímica, así como los resultados biológicos del experimento in vivo demuestran el incremento de la ecotoxicidad con respecto al flujo de la corriente del agua y al número de fuentes de contaminación.

De acuerdo con los resultados obtenidos el daño al ADN de la especie expuesta es mayor en le río Zahuapan y disminuye relativamente después de la confluencia con el río Las Cuevas comprueba que la carga total de la toxicidad del río Las Cuevas no incrementa la ecotoxicidad del agua y sedimento del río Zahuapan.

Aunque los resultados demuestran que existe riesgo en esta ANP, es menor con respecto a otros ecosistemas acuáticos del estado de Tlaxcala, por lo tanto es necesario realizar un monitoreo ambiental y biológico que permitan identificar otros contaminantes, cuantificar su acumulación y evaluar su efecto, no solo en peces sino en otros organismos, para ampliar los

datos que contribuyan a la búsqueda de estrategias de mitigación de la contaminación, así como de conservación de la RE Las Cuevas.

6. REFERENCIAS

- Al-Sabti, K. (1995). An in vitro binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity testing in fish. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 335(2), 109–120. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(95\)90048-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(95)90048-9)
- Al-Sabti, K. and, & Metcalfe, C. D. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 343(2–3), 121–135. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)90078-0)
- Alloway, B. J. (1990). Heavy metals in soils. In *Heavy metals in soils*. [https://doi.org/10.1016/s0165-9936\(96\)90032-1](https://doi.org/10.1016/s0165-9936(96)90032-1)
- Amiard-Triquet, C. and, & Berthet, B. (2015). Individual Biomarkers. In *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks* (pp. 153–182). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800949-9.00007-3>
- Azqueta, A., Gutzkow, K. B., Priestley, C. C., Meier, S., Walker, J. S., Brunborg, G., & Collins, A. R. (2013). A comparative performance test of standard, medium- and high-throughput comet assays. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 768–773. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.12.006>
- Baccaro, K., Degorgue, M., Lucca, M., Picone, L., Zamuner, E., Andreoli, Y. (2006). *Consumo humano y riego quality of water for human consumption and irrigation*. 35(3), 95–110.
- Baird, R., & Bridgewater, L. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.
- Bolognesi, C. and Hayashi, M. (2011). *Micronucleus assay in aquatic animals*. 26(1), 205–213. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq073>
- Broeg, K., Westernhagen, H., Zander, S., Korting, W., Koehler, A. (2005). The “ bioeffect assessment index ” (BAI) A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Science Direct*, 50, 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.02.042>
- Brugnoli, E., Muniz, P., Venturini, N., Burone, L., Willis, I. (2007). *Environmental perturbation and Coastal benthic biodiversity in Uruguay* (Issue January).
- Candia, C. (1991). *Sobre la distribución de la carpa (Cyprinus carpio) en el río de la plata y en cuerpo de agua de la providencia de Buenos Aires*.
- Carrillo, J. A. (2007). *Mapas geoquímicos de metales pesados de suelos del Estado de Tlaxcala, México*. [Tesis de Maestría. Centro de Geociencias. Universidad Nacional Autónoma de México].
- Castillo-Guerrero, A., Gonzáles-Medina E., G.-B. M. A. (2009). Patterns of occurrence and abundance of land birds on Saliaca Island , Sinaloa , Patrones de presencia y abundancia de aves terrestres en la isla Saliaca , Sinaloa , México Patterns of occurrence and abundance of land birds on Saliaca Island , Sinaloa , M. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, January 2017.
- Chavan, P., Kumar, R., Joshi, H., Kirubakaran, R., Venugopalan, V. P. (2018). Multimarker study of the effects of antifouling biocide on benthic organisms : results using *Perna viridis* as candidate species. *Environ Sci Pollut Res*, 20407–20418. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9607-z>
- Colautti, D. C. (1997). *Ecología de la carpa (Cyprinus carpio) en la cuenca del Río Salado, Provincia de Buenos Aires*. December 1997.
- Colin, N., Porte, C., Fernandes, D., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., Sostoa, A., & Piña, B., Maceda-Veiga, A. (2015). Science of the Total Environment Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Science of the Total Environment*, The. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.099>
- Crivelli, A. (1980). *The biology of the common carp, Cyprinus carpio L. in the Camargue, southern France*. November. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1981.tb03769.x>
- Crivelli, A. (1983). *The destruction of aquatic vegetation by carp*. January 1983. <https://doi.org/10.1007/BF00016414>
- Cutimbo, C. A. (2012). *Calidad bacteriológica de las aguas subterráneas de consumo humano en centros poblados menores de la Yarada y los palos del Distrito de Tacna*. [Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann].
- Fasulo, S., Mauceri, A., Maisano, M., Giannetto, A., Parrino, V., Gennuso, F., Agata, A., D'Agata, S. (2010). Ecotoxicology and Environmental Safety Immunohistochemical and molecular biomarkers in *Coris julis* exposed to environmental contaminants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5), 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.12.025>
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular*

- Mechanisms of Mutagenesis*, 455, 81–95.
- Flores
- Galán-Huertos, E. y Romero-Baena., A. J. (2008). Contaminación de suelos por metales. *Revista de La Sociedad Española de Mineralogía*.
- Galvis-Monroy, I. A. y Barrera-Ariza, L. (2010). Sensibilidad y resistencia de gérmenes intra y extra hospitalarios en el hospital infantil universitario de la Cruz Roja de Manizales, 2007. *Luna Azul*.
- Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G., Glick, B. (2009). Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Canadian Journal of Microbiology*, 55, 501–514. <https://doi.org/10.1139/w09-010>
- García, M. (1998). Capítulo 7 del manual de Ingeniería de ríos. In *Origen y propiedades de los sedimentos*.
- García, S. (2009). “Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad producida por el aluminio en linfocitos de la carpa (*Cyprinus carpio*) .” [Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional].
- González, M. N., Orozco, C., Pérez, A., Alfayate, J. M., Rodríguez, F. J. (2002). *Contaminación ambiental. Una visión desde la química*.
- Grisolia, C. K. (2002). A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 518(2), 145–150. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00086-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00086-4)
- Guevara, J. y Moya, V. (1995). *Toxicología médica*.
- Guilar, M. E. (2007). Las ideas de Bruner: “De la revolución cognitiva” a la “Revolución cultural.” *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal*, 345–392. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4160-3080-5.50015-8>
- Herrera, K. L. (1999). *Indicadores biológicos de la calidad del agua del río Polochic y de la integridad biológica del lago de Izabal*. [Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias y Humanidades. Departamento de Biología. Universidad del Valle de Guatemala].
- Hooftman, R. N. and Raat, W. K. (1982). *Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow Umbra pygmaea by ethyl methanesulphonate*. 104, 147–152.
- Hose, E., Cross, J. N., Smith, S. G., Diehl, D. (1987). Elevated Circulating Erythrocyte Micronuclei in Fishes from Contaminated Sites off Southern California Jo Ellen Hose , ~ Jeffrey N . Cross , b Steven G . Smith ". *Marine Environmental*, 22.
- Kheir, M. M., Wang, Y., Hua, L., Hu, J., Li, L., Lei, F., Du, L. (2010). Acute toxicity of berberine and its correlation with the blood concentration in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48(4), 1105–1110. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.033>
- Koehn, J. D. and Gehrke, P. (2000). *Managing the Impacts of common carp* (Issue August).
- Koehn, J. D. (2004). Carp (*Cyprinus carpio*) as a powerful invader in Australian waterways Carp (*Cyprinus carpio*) as a powerful invader in Australian waterways. *FRESHWATER BIOLOGY*, JUNE 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2004.01232.x>
- Lebeau, T., Braud, A., Je, K. (2008). Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Science Direct*, 153. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.09.015>
- López-Branco, S. M. (2021). Análisis de los parámetros fisicoquímicos de las aguas residuales domésticas, generadas en la subestación eléctrica de Cerromatoso localizada en el municipio de Montelíbano. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 14, Issue 1).
- Luis, S A., Arrango, M. C., Álvares, L. F., Arango, G. A., Torres, O. E., Monsalve, A. J. (2008). Calidad del agua de Las Quebradas La Cristalina y La Risaralda, San Luis, Antioquia. *Revista EIA, Número 9*, 121–141.
- McDowall, R. M. (1996). *Freshwater fishes of south-eastern Australia*.
- Obrebski, S. (1986). The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger Special Studies/Praeger Scientific. *The Quarterly Review of Biology*, 136–137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/414841>
- Pérez-González, R., García-Ros, F. (2011). Validez predictiva e incremental de las habilidades de autorregulación sobre el éxito académico en la universidad Predictive and Incremental Validity of Self-regulation Skills on Academic Success in the University. *Revista de Psicodidáctica*.
- SEMARNAT. (2008). *Capítulo 6. Agua* (pp. 259–324). http://www.semarnat.gob.mx/archivosanteriores/informacionambiental/Documents/pdf/cap_6_agu

- a.pdf Siancas- Columbus (2018). Estudio del comportamiento de sedimentos en bifurcaciones para bocatomas, mediante modelación numérica (Tesis para optar el título de Ingeniero Civil). Universidad de Piura, Facultad de Ingeniería. Programa Académico de Ingeniería Civil. Piura, Perú.
- Sun H., Wang N., Cang Z., Zhu C., Zhao L., Nie X., et al. (2010). Modulation of microbiota-gut-brain axis by berberine resulting in improved metabolic status in high-fat diet-fed rats. *Obes. Facts.* 9, 365–378. doi: 10.1159/000449507
- Solari, A. García, M. L. & Jaureguizar, A. J. (2009). Fish fauna from the Ajó River in Campos del Tuyú National Park, province of Buenos Aires, Argentina. *Checklist* 5(4), 807-811.
- Soriano, A. (1991). Río de la Plata Grasslands. En: *Ecosystems of the World: Natural Grasslands*, (Ed. Coupland, R. T.), 367-408 Elsevier, Amsterdam, 469 pp.
- Swain, D. P. (1979). Biology of the carp (*Cyprinus carpio* L.) in North America and its distribution in Manitoba, North Dakota and neighbouring U.S. waters. MS Report 79-73. Manitoba Department of Mines, Natural Resources and Environment, 36 pp.
- Swee, U. T. & McCrimmon, H. R. (1966). Reproductive biology of carp, *Cyprinus carpio* L., in Lake St. Lawrence, Ontario. *Transaction of the American Fisheries Society* 95, 372-380.
- Sivakumaran, K. P.; Brown, P.; Stoessel, D. & Giles, A. (2003), Maturation and reproductive biology of female wild carp, *Cyprinus carpio*, in Victoria, Australia. *Environmental Biology of Fishes* 68, 321-332.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cellular Research*, 175:184-191.
- Singh NP. 2000. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research*, 455:111-127
- UNESCOWWAP, 2007 **El Agua, una responsabilidad compartida: 2. informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo**
<https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000149519.locale=es>
- Volke-Sepúlveda, T., Velasco-Trejo, J. A., & De la Rosa-Pérez, D. A. (2005). Suelos contaminados por metales pesados y metaloides. México: INE-Semarnat
- Vernier, P., Maron, S. & Canova, S. 1997. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzol [a] pyrene. *Mutation Research*, 390: 33- 44.
- Vitousek *et al.* 1997 CCT/CIEDES, 1998. Estudio de cobertura forestal actual (1986/1997) y de cambio de cobertura entre 1986/1987 y 1996/1997...
- Vigreux C, Poul JM, Deslandes E, Lebailly P, Godard T, Sichel F, Henry-Amar M, Gauduchon P. 1998. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. *Mutation Research*, 419:79-90.
- Carballo M.A., Hick A.S., Solonesky S., Larramendy M.L., Mudry M.D. (2006). Genotoxic and aneugenic properties of an imidazole derivative. *J. Appl. Toxicol.* 26
- Ormaza, C. (2011). Desinfección solar en el agua del río Tomebamba. Monografía Ingeniería Civil. Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Okonkwo, J.C., Obiakor, M.O. & Nabude, P.C. 2011. Micronuclei profile: an index of chromosomal aberrations in freshwater fishes (*synodontis clarias* and *tilapia nilotica*). *Journal of Animal and Feed Research*, 1(1): 40-45.
- Rivera, N.; Encina, F.; Palma, R. y Mejias, P. (2009). La Calidad de las Aguas en el Curso Superior y Medio del Río Traiguén: IX Región-Chile. *Información tecnológica.* 20(4), 75-84.
- Ríos-Martínez, 2017, Evaluación de la genotoxicidad de suelos y residuos mineros con células de raíz de haba (Vicia faba)
- Torres-Bugarín, O. (2000). Evaluación de la genotoxicidad de las drogas antineoplásicas mediante el conteo de micronúcleos y otras anomalías nucleares en mucosa bucal y micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica. Tesis doctoral. Guadalajara, Jalisco, México: Universidad de Guadalajara.
- Torres-Bugarín, O., Zavala-Cerna, M. G., Macríz Romero, N., Flores-García, A., & Ramos-Ibarra, M. L. (2013). Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. *El Residente.* 8 (1), 4-14.
- Wilson JT, Pascoe PL, Parry JM, Dixon DR. 1998. Evaluation of the comet assay as a method for the

- detection of DNA damage in the cells of marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutation Research*, 399:87-95.
- Yan, L., Yinguang, C. and Qi, Z. (2007). Effect of initial pH control on enhanced biological phosphorus removal from wastewater containing acetic and propionic acids. *Chemosphere*. 66, 123-129.
- Young, S. D. (2012). Chemistry of heavy metals and metaloids in soils. En B. J. Alloway (Ed.), *Heavy metals in soils trace metals and metaloids in soils and their bioavailability*. Berlin: Springer
- Kawamura, S. (2000). *Integrated desing and operation of water treatment facilities* (Second ed.). Nueva York, EUA: John Wiley & Sons, Inc.
- Kottelat, M. and Freyhof, J. (2007) *Handbook of European Freshwater Fishes*. Kottelat, Cornol & Freyhof, Berlin, xiv + 646 p.
- Koppe C. (2002). A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutat. Res*. 518, 145-150.
- Tomasini, A. C. (2000). *Serie autodidáctica en materia de normas técnicas relacionadas con la inspección y verificación*.
- Møller P. The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis*. 2018 Feb 24;33(1):1-7.
doi: 10.1093/mutage/gex046. PMID: 29325088.
- Bolognesi, C., Cirillo, S., & Chipman, J. K. (2019). Comet assay in ecogenotoxicology: applications in Mytilus sp. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. doi:10.1016/j.mrgentox.2019.05.004*
10.1016/j.mrgentox.2019.05.004
downloaded on 2019-07-26
- Peña C. E., Carter D. E. y Ayala-Fierro F. 2001. Toxicología Ambiental, Evaluación de riesgos y restauración ambiental. Distribuido en Internet via The Southwest Hazardous Waste Program. 203 p. (En línea). Disponible en <http://toxamb.pharmacy.arizona.edu/toxamb.pdf> (mayo de 2023).
- Citation:** de Lapuente J, Lourenço J, Mendo SA, Borràs M, Martins MG, Costa PM and Pacheco M (2015) The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. *Front. Genet.* 6:180. doi: 10.3389/fgene.2015.00180

PABON, S. E.; BENITEZ, R.; SARRIA, R. A. and GALLO, J. A..Contaminación del agua por metales pesados, métodos de análisis y tecnologías de remoción. Una revisión. *Entre Ciencia e Ingeniería* [online]. 2020, vol.14, n.27, pp.9-18. Epub Mar 20, 2021. ISSN 1909-8367. <https://doi.org/10.31908/19098367.0001>.

Romero-Lázaro EM, Ramos-Pérez D, Romero, FM, Sedov, S. 2019. INDICADORES INDIRECTOS DE CONTAMINACIÓN RESIDUAL EN SUELOS Y SEDIMENTOS DE LA CUENCA DEL RÍO SONORA, MÉXICO. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 35(2), 371-386.