



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio genotóxico en renacuajos (*Ecnomiohyla miotympanum*) del Río Escanela expuestos a residuos mineros de Pinal de Amoles, Querétaro.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Ambientales

Presenta

I.Q. Rodolfo Balcázar Regalado

Dirigida por:

M. en C. Miguel Ángel Rico Rodríguez

Santiago de Querétaro, Querétaro. Mayo 2011



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencias Ambientales

Estudio genotóxico en renacuajos (*Ecnomiohyla miotypanum*) del Río Escanela expuestos a residuos mineros de Pinal de Amoles, Querétaro.

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Ambientales

Presenta:

I.Q. Rodolfo Balcázar Regalado

Dirigida por:

M. en C. Miguel Ángel Rico Rodríguez

SINODALES

M. en C. Miguel Ángel Rico Rodríguez

Presidente

M. en C. Ma. Eustolia Rodríguez Muñoz

Secretario

Dra. Maricela González Leal

Vocal

Dr. Miguel Ángel Rea López

Suplente

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Suplente

Q.B. Magali Elizabeth Aguilar Ortiz

Directora de la Facultad de Química

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Mayo de 2011
México

RESUMEN

La minería en México y en específico el estado de Querétaro es considerada como una fuente de empleo y de generación de residuos que provocan contaminación. En el municipio de Pinal de Amoles se encuentra una mina situada a orillas del Río Escanela, cuya principal explotación es la plata, plomo y zinc, generando residuos que llegan a contaminar este cauce. En el año de 2006 fueron observados peces de especie *Astianax mexicanus* (sardinita mexicana) con malformaciones en la espina dorsal. En un sitio cercano a la mina. Estos hallazgos motivaron a la realización de este estudio cuyos objetivos fueron determinar la concentración de metales pesados en agua, sedimento y renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum*. En este estudio fue utilizado el método electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa), para determinar la genotoxicidad y espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción (ICP-MS) para determinación de metales pesados en agua, sedimentos y renacuajos. Los resultados revelaron la presencia de plomo en tres matrices estudiadas. Las concentraciones de plomo en renacuajos fue de 5.8 a 263.5 µg/g río arriba y 0.1 a 201.1 µg/g río abajo; en agua fueron entre 0.01 y 3.51 µg/L río arriba, y de 0.85 y 38.08 µg/L río abajo de la mina; los sedimentos fueron 499.2 a 14254.7 µg/g río arriba y de 835.7 a 5925.8 µg/g río abajo. En los renacuajos fue detectado mayor daño genotóxico en los puntos río abajo de la mina; este daño fue determinado en las características, longitud de cauda, con valores máximos de 9.1 µm, en puntos río abajo de la mina contra un valor máximo de 4.3 µm, en los puntos río arriba de la mina. En momento de Olive fue 12.9 contra 3.96; y momento de cauda fue 13.9 contra 3.16 río abajo contra río arriba respectivamente. Los resultados obtenidos nos indican que el plomo, puede estar causando daño genotóxico en renacuajos nativos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum*.

(Palabras clave: *Ecnomiohyla miotympanum*, electroforesis unicelular alcalina, espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción, genotoxicidad, plomo).

ABSTRACT

Mining in Mexico and specifically in Querétaro, is considered a source of employment and generation of wastes that cause pollution. In the town of Pinal de Amoles, there is a mine located on the banks of River Escanela, which holds mainly silver, lead and zinc, causing contamination of the sewage reaching the runway. In 2006, fish species *Astianax mexicanus* (sardinita mexicana) were observed with malformations in the spine, at a site close to the mine. These findings led to the completion of this study which has the objective of determining the concentration of heavy metals in water, sediment and tadpoles of the species *Ecnomiohyla miotympanum*. In this study, we used the alkaline single cell electrophoresis method (comet assay) to determine the genotoxicity and mass spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-MS) for determination of heavy metals in water, sediment and tadpoles. The results revealed the presence of lead in the three matrixes studied. Lead concentrations in water were between 0.01 and 3.51 µg/L upstream and 0.85 and 38.08µg/L downstream from the mine; the sediments were from 499.2 to 14254.7µg/g upstream and 835.7 to 5925.8µg/g, downstream. In tadpoles, they were from 5.8 to 263.5µg/g upstream, and 0.1 to 201.1µg/g downstream. In tadpoles an increase of genotoxic damage was detected at points downstream from the mine; this damage was determined in three parameters, tail length, with a maximum of 9.1µm downstream of the mine against a maximum value of 4.3 µm, upstream of the mine. In Olive moment was 12.9 against 3.96, and tail moment was 13.9 to 3.16 downstream from upstream, respectively. The results obtained indicate that lead may be causing genotoxic damage in tadpoles of the native species *Ecnomiohyla miotympanum*.

(Keywords: *Ecnomiohyla miotympanum*, alkaline single cell electrophoresis, inductively coupled plasma mass spectrometry, genotoxicity, lead).

**A mi esposa Leticia y
Mis hijas Pali y Diana**

AGRADECIMIENTOS

A mi Director de Tesis M.C. Miguel Ángel Rico Rodríguez por su tiempo y dedicación para desarrollar este trabajo tan satisfactorio en campo. A la M.C. Eustolia Rodríguez Muñoz por su gran apoyo en el laboratorio para la realización completa de las pruebas de daño genético. A las M.C Ofelia Pérez Arvizu y Ma. Carolina Muñoz Torres y al Dr. Jaime Alejandro Carrillo Chávez, por el apoyo en los análisis de las muestras en las instalaciones del Centro de Geociencias del laboratorio de Geoquímica Ambiental de UNAM Campus Juriquilla.

Un especial agradecimiento al Grupo Ecológico de la Sierra Gorda A.C. que con su apoyo, nos dio la oportunidad de desarrollar el estudio, con la intención de verificar indicios de contaminación e impacto ambiental en el Río Escanela.

A mis sinodales y a “todos los maestros” de la carrera de maestría en ciencias ambientales, por sus aportaciones y compartir sus experiencias y conocimientos; así también un agradecimiento especial a mis sinodales.

Dra. Maricela González Leal

Dr. Miguel Ángel Rea López

Dr. Mamadou Moustapha Bah

A todos los compañeros de clase que pasamos momentos muy agradables y buenos y a veces malos pero siempre con el entusiasmo salimos adelante, Mau, Tere, Nora, Faby, César, Marthitas, Güera, Jorge y Ruth, y también por supuesto a Gaby, un abrazo a todos.

A los que me ayudaron en los múltiples muestreos de peces *Astianax mexicanus* (*sardinita mexicana*) que fue un excelente reto mantenerlos vivos en el laboratorio, y en los muestreos de los renacuajos *Ecnomiohyla myotimpanum* (*ranita arborícola*). A mi esposa, mis hijas, mi hermano Pepe, al Charas, y a los alumnos incondicionales del Maestro Rico (Flavio, Gisela, Macías, Edith, Efraín), así como a los chamacos del río en Ahuacatlán y Río Escanela, ya que sin todos no ellos, no hubiera sido imposible realizar este estudio, gracias.

Al Ing. Sergio Amín Chufani Abarca que me dio la oportunidad de trabajar y estudiar; y por último a todas aquellas personas que se me olvidan, pero que en cierto momento me apoyaron de una u otra forma para terminar con este objetivo en mi vida, gracias.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISION DE LITERATURA	2
2.1 Contaminación	2
2.2 La minería en México	3
2.3 La minería en Querétaro	5
2.4 Problemática de la minería en Pinal de Amoles	6
2.5 Contaminación por actividad minera	8
2.6 Contaminación por metales pesados	9
2.7 Contaminación por desperdicios mineros	9
2.8 Contaminación por plomo	10
2.9 Contaminación del agua por plomo	11
2.10 Contaminación del suelo por plomo	12
2.11 Efectos toxicológicos del plomo en anfibios	13
2.12 Normatividad	16
2.13 Genotoxicidad	21
2.13.1 Ensayo cometa	21
2.14 Espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	25
Objetivo General	25
Objetivos Particulares	25
III. METODOLOGÍA	26
3.1 Sitio de estudio	26

3.2 Renacuajos	27
3.2.1 Muestreo de renacuajos	27
3.2.2 Obtención de sangre de renacuajos	30
3.2.3 Preparación de laminillas	30
3.2.4 Electroforesis unicelular alcalina	30
3.3 Muestreo de sedimento	31
3.3.1 Muestreo	31
3.4. Muestreo de agua	31
3.5 Descripción de la metodología	32
3.5.1 Metodología del análisis de electroforesis unicelular alcalina	32
3.5.2 Metodología del análisis de ICP-MS	32
3.6 Análisis estadístico	35
IV. RESULTADOS	36
4.1 Plomo en agua	36
4.2 Plomo en sedimentos	44
4.3 Plomo en renacuajos	49
4.4 Evaluación del daño genotóxico	54
V. DISCUSIÓN	74
VI. CONCLUSIONES	80
LITERATURA CITADA	81

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
2.1	Producción de algunos Metales en México	4
2.2	Límites máximos permisibles de metales pesados en normas mexicanas.	18
2.3	Toxicidad en organismos por compuestos de plomo	19
2.4	Guías médicas y ambientales para la toxicidad del plomo	20
4.1	Concentración promedio de metales en el Río Escanela detectados pos ICP-MS	37
4.2	Concentración promedio de plomo en agua por ICP-MS	40
4.3	Comparación estadística por el método de Tukey y Kramer de concentración promedio de plomo en agua	41
4.4	Comparación de valores promedio de concentración de plomo en agua contra las normas de referencia	43
4.5	Concentración promedio de plomo en sedimentos por ICP-MS	46
4.6	Comparación estadística de puntos de muestreo de concentración promedio de plomo en sedimentos.	47
4.7	Concentración promedio de plomo en sedimentos contra la normatividad para suelos NOM 147	48
4.8	Concentración promedio de plomo en renacuajos por ICP-MS	51
4.9	Comparación estadística de puntos de muestreo de concentración promedio de plomo en renacuajos.	52
4.10	Concentración promedio de plomo en agua, sedimentos y renacuajos	53
4.11	Matriz que indica las comparaciones realizadas entre fechas, puntos y grupos de muestreo	56
4.11.1	Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie <i>Ecnomiohyla miotympanum</i> en cada punto río arriba de la mina.	58

4.11.2	Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie <i>Ecnomiohyla miotympanum</i> río abajo de la mina.	60
4.11.3	Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie <i>Ecnomiohyla miotympanum</i> entre puntos por fecha de muestreo río arriba de la mina.	62
4.11.4	Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie <i>Ecnomiohyla miotympanum</i> entre puntos por fecha de muestreo río debajo de la mina.	63
4.11.5	Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie <i>Ecnomiohyla miotympanum</i> entre todos los puntos por fecha de muestreo.	66
4.11.6	Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie <i>Ecnomiohyla miotympanum</i> entre los puntos río arriba y río abajo de la mina en los parámetros de longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda.	67
4.11.7	Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie <i>Ecnomiohyla miotympanum</i> entre todos los puntos de transecto Río Escanela.	68
4.11.8	Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie <i>Ecnomiohyla miotympanum</i> entre dos puntos río arriba contra río debajo de la mina.	69
4.12	Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie <i>Ecnomiohyla miotympanum</i> contra concentraciones de plomo en renacuajos, sedimentos y agua.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
2.1	Ubicación del Río Escanela en la Sierra Gorda.	7
2.2	Anormalidades en ranas arborícolas del pacífico de la especie <i>Hyla regilla</i> por contaminación de agua en Corvalo Oregon USA.	15
2.3	Crecimiento atrofiado en ranas seleccionadas de ríos y lagos de Yorkshire en el Reino Unido	15
3.1	Puntos de muestreo de agua, renacuajos y sedimentos en el transecto seleccionado en el Río Escanela	28
3.2	Puntos de muestreo ilustrativos	29
3.2	Diseño del experimento para determinación del daño genotóxico.	33
3.3	Diseño del experimento para el análisis de plomo en agua, sedimentos y renacuajos, por ICP-MS	34
4.1	Concentración promedio de plomo en agua, en el transecto Río Escanela por ICP-MS.	38
4.2	Concentración promedio de plomo en sedimentos por punto de muestreo en el transecto del Río Escanela.	45
4.3	Concentración promedio de plomo en renacuajos por punto de muestreo, en el transecto Río Escanela	50
4.4	Núcleos representativos de células de renacuajos de la especie <i>Ecnomiohyla miotympanum</i> en muestras obtenidas río arriba y río abajo de la mina del transecto del Río Escanela.	49
4.5	Distribución de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie <i>Ecnomiohyla miotympanum</i> en los parámetros de longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda en el transecto del Río Escanela.	72
4.6	Comparación de daño genético en renacuajos <i>Ecnomiohyla miotympanum</i> contra la concentración de plomo en renacuajos, sedimentos y agua en el transecto del Río Escanela.	73

I. INTRODUCCIÓN

La industria minera en nuestro país ha sido una fuente de explotación importante desde hace más de 600 años, y un problema de contaminación en muchos ecosistemas. El Río Escanela es uno de estos casos, situado en el municipio de Pinal de Amoles en el estado de Querétaro, y que está dentro de la reserva de la biosfera de la Sierra Gorda (Enciclopedia de Municipios, 2005). Esta actividad trajo consigo un gran desarrollo económico en esta zona geográfica del país generando asentamientos humanos cerca de donde eran explotadas las vetas mineras de oro y plata. Las actividades mineras continúan desarrollándose en el Río Escanela de Pinal de Amoles y no se ha considerado el daño al medio ambiente que se está provocando. En la ribera del Río Escanela, se encuentra una mina que se viene explotando desde hace más de 600 años. En este lugar, se extrae mineral y es llevado a otro lugar para procesarlo. Sin embargo, parte de material es arrojado al río. Este material está aportando al río alteraciones en las composiciones físicas y químicas en río, por lo tanto dicha explotación, ha generado acumulación, liberación y dispersión de metales tales como plomo, cadmio, cobre, zinc, fierro, manganeso vanadio y arsénico al medio ambiente afectando el recurso hídrico.

En el presente estudio se determinaron las concentraciones de algunos metales pesados en un transecto seleccionado de 6 puntos sobre el Río Escanela, tres puntos fueron seleccionados arriba de la mina y tres puntos río abajo del nivel de la mina. Se determinó plomo; en agua, sedimentos y renacuajos, lo que sugiere que la contaminación provocada por la actividad de la mina cercana al Río Escanela, pudiera estar causando daño genotóxico a renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum*. Para valorar la importancia de la aportación de metales pesados por parte de la mina, hacia el río, se establecieron tres puntos río arriba y tres río abajo de la mina, determinándose en agua concentraciones de plomo y daño genético. Se compararon para determinar diferencias estadísticas significativas que nos indiquen que la mina está afectando a la especie nativa del renacuajo *Ecnomiohyla miotympanum*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Contaminación

En muchos procesos de fabricación se generan subproductos y residuos que son transportados por el agua y aire, éstos a veces resultan más tóxicos que las materias primas, por lo tanto las sustancias químicas experimentan una serie de transformaciones físicas y químicas incluida su contaminación con otros productos químicos que aumentan su toxicidad (Vega,1985). Como consecuencia de estas transformaciones químicas, puede ocurrir que un producto relativamente inofensivo se convierta en un producto tóxico en el medio ambiente, incluso que ingrese en la cadena alimenticia y se acumule en los organismos, los cuales finalmente pueden llegar a ser consumidos por el ser humano. Esos compuestos se pueden comportar como carcinógenos y teratógenos o bien, pueden tener efectos que afecten la salud de organismos y ecosistemas, sin embargo se desconoce mucho acerca de estos aspectos (Cortés-Eslava, 1993).

2.2 La minería en México

La minería en México tiene gran importancia histórica, porque ha sido una fuente importante en el desarrollo social, político, económico y religioso. Nuestro país tiene enormes riquezas de recursos naturales y entre ellos están los metales preciosos como el oro y la plata. La minería se remonta desde nuestros antepasados indígenas. Poco se sabe acerca de las técnicas de explotación que utilizaban nuestros antepasados ya que solo contaban con herramientas de piedra y de vegetales las cuales con el esfuerzo físico realizaban las actividades mineras. No conocían el hierro, sin embargo, recuperaban metales de las minas. Algunos historiadores mencionan que los aztecas en la época de Moctezuma recibían tributo en minerales de 18 provincias. En estas se encontraban las minas del Cerro del Águila en Guerrero donde se

explotaba el cobre, el Cerro de Navajas para la explotación de obsidiana, en San Joaquín, en el Fuerte de Ranas en el estado de Querétaro para el mercurio y en Taxco Guerrero, el estaño. El conocimiento de los indígenas acerca de las minas era tal que guiaban a los conquistadores hasta los lugares de riqueza mineral (Vargas, 1949).

A través de los años, México ocupó un lugar importante en la producción de metales preciosos, principalmente en plata, ya que tenía la mayor cantidad de minas de plata en la época de la colonia. La plata era muy demandada en Europa y casi toda era aportada por la corona española que le llegaba de la explotación en México. El oro solo se le consideraba acompañante de la plata, llamados metales preciosos actualmente, siempre estaban acompañados de impurezas de otros metales como plomo, cobre y zinc; esta situación fue un reto para el hombre encontrar mejores procesos físicos y químicos para obtener metales más puros, entre los cuales están la fundición, la amalgamación con mercurio, después la lixiviación con ácido clorhídrico e hiposulfito de sodio, cianuración y por último la flotación química. Es importante resaltar el hecho de que la minería es una medida del progreso de la humanidad y México no fue la excepción, ha tenido grandes riquezas minerales las cuales han sido explotadas para crear riqueza, poder político, social y religioso. Estos poderes han tenido transiciones a través de los años y han pasado de unas manos a otras, incluyendo capitales extranjeros. Actualmente, se siguen explotando y las ganancias son afectadas por el control de precios de los mercados internacionales que se mueven acorde a los beneficios particulares de algunos cuantos. México actualmente tiene yacimientos mineros en 32 entidades federativas con explotación principal de 10 minerales (oro, plata, plomo, cobre, zinc, fierro, coque, azufre, barita y fluorita) y se encuentra posicionado a nivel nacional e internacional (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Producción de algunos metales en México

Metal	Estado	Volumen	Lugar en México	en México en el Mundo
Oro	Durango	8567 Kg	1°	
	Sonora	5895 Kg	2°	9°
	Querétaro	1363 Kg	3°	
Plata	Zacatecas	1345130 Kg	1°	
	Durango	411 568 Kg	2°	3°
	Chihuahua	264 440 Kg	3°	
Cobre	Sonora	349 227 Ton	1°	
	Zacatecas	24 944 Ton	2°	11°
	San Luis	18 072 Ton	3°	
	Potosí			
Plomo	Zacatecas	51 904 Ton	1°	5°
	Chihuahua	43 379 Ton	2°	
	Durango	8 590 Ton	3°	

Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2004 (INEGI).

2.3 La minería en Querétaro

La zona minera en el estado de Querétaro se encuentra ubicada en la Sierra Gorda, zona montañosa, señal natural de la posible existencia de minerales en el interior de la corteza terrestre. En el año de 1552, cuando los españoles descubrieron el proceso de amalgamación, iniciaron de manera importante en todo México la explotación de la minería y fueron creadas pequeñas poblaciones en la Sierra Gorda Queretana donde anteriormente se sabía de la existencia de minas y también surgieron nuevos descubrimientos de sitios mineros principalmente en los municipios que ahora se conocen como San Joaquín, Peñamiller, Cadereyta de Montes y Pinal de Amoles. En estos pueblos, hubo un importante desarrollo de la minería, lo que generó la creación de comunidades de gran desarrollo económico. También existía una gran población de pueblos indígenas como los Otomíes, Jonáces, Pámes y Chichimecas que se oponían al desarrollo y conquista de las tierras que por siglos habían sido dominadas por ellos. En la Sierra Gorda hubo a través de su historia grandes desarrollos económicos, sociales políticos y religiosos, viéndose beneficiados en diferentes escalas los dueños de las minas, poderosos hacendados, Virreyes y la comunidad con fuentes de trabajo, hasta la Corona Española que se beneficiaba con los tributos en oro y plata de estos lugares (Vargas, 1949).

La Sierra Gorda queretana ha tenido las ventajas para el desarrollo de la minería con grandes extensiones para los procesos de obtención del oro y plata. A través de los años han existido varias técnicas para los procesos de extracción y obtención de metales preciosos; El proceso de amalgamación con mercurio estuvo a la vanguardia por más de 200 años en la Nueva España y posteriormente se conoció la cianuración, lixiviación y flotación química. El agua necesaria para estos procesos de extracción entra al proceso como agua limpia y después sale contaminada con metales pesados y productos químicos utilizados en los procesos para la separación y concentración de los metales preciosos, estas aguas son vertidas a cuencas y suelos (Enciclopedia de Municipios, 2005).

2.4 Problemática de la minería en Pinal de Amoles

El Municipio de Pinal de Amoles, cabecera municipal con el mismo nombre, se localiza en las siguientes coordenadas, N 20° 58 – 21° 21´ , O 99° 26´- 99° 43´, con una distancia aproximada de 153 km desde la capital del Estado de Querétaro. El Municipio de Pinal de Amoles representa el 6.4% (705.4km²) de la superficie total del estado de Querétaro. Colinda al Norte con los municipios de Arroyo Seco y Jalpan de Serra, al este con Jalpan y San Joaquín, al Sur con San Joaquín, Cadereyta de Montes y Peñamiller, al oeste con Peñamiller y el estado de Guanajuato (INEGI, 2005). Pinal de Moles se encuentra en la parte alta de la sierra queretana a 2320 metros sobre el nivel del mar con clima templado subhúmedo con temperaturas promedio de 20°C, muy frío en invierno y caluroso en verano. La vegetación característica es de bosques de pino y encino. Esta región forma parte de la Reserva de la biósfera declarada por el Gobierno Federal Mexicano en mayo de 1997 y declarada como reserva de la biósfera mundial por la UNESCO en el año 2001 (figura 2.1).



Figura 2.1 Ubicación del Río Escanela en la Sierra Gorda. Una elipse en el centro identifica el sitio de estudio, en el Municipio de Pinal de Amoles Querétaro (UNESCO MAB Biosphere Reserves. 2001).

A finales del siglo XVI la región del semidesierto y el Cerro Gordo, ahora llamado por su extensión Sierra Gorda, fueron descubiertas las minas de Maconí, ahora llamado Municipio de Cadereyta de Montes, con ricos yacimientos de plata coincidiendo en 1599 con los yacimientos de Real de Escanelas. Estos lugares eran habitados por Chichimecas, Pámes y Jonáces. En 1606 fue descubierto el Mineral de San José Términos de Escanela hoy Pinal de Amoles. En 1609, se le dio a este lugar la categoría de Alcaldía Mayor Real y Minas de Escanela comprendiendo su jurisdicción los actuales municipios de Arroyo Seco, Jalpan de Serra, Landa de Matamoros, Pinal de Amoles, San Joaquín, Peñamiller y Cadereyta de Montes. En 1675, Escanelas pasó a Cadereyta por la decadencia del volumen de plata (Vargas, 1949).

2.5 Contaminación por actividad minera

La minería es considerada una de las actividades de mayor impacto ecológico a nivel mundial provocada por el hombre porque altera la composición del agua, suelo y aire, causando la alteración de la superficie por las actividades mineras, por la creación de caminos, hoyos de perforación, fosas, sitios de preparación, movimientos de tierras y la contaminación visual del paisaje. Del material extraído, el mayor porcentaje es residuo (al menos del orden de 99.9998%) este residuo viene acompañado de acuerdo a los parámetros y naturaleza del terreno con metales pesados, los cuales son peligrosos para la biodiversidad de las especies, incluyendo el hombre. Las actividades mineras afectan la superficie de la tierra y su entorno en general, contaminan el aire, afectación de las aguas superficiales y subterráneas, afectación de suelos, sobre la flora con la eliminación de vegetales en las áreas de explotación, sobre la flora y fauna de la superficie y la que vive en los ríos. El ruido influye sobre las poblaciones, y el conflicto entre personas por el derecho de la tierra y el surgimiento de asentamientos sin control; cambios en el microclima y un considerable impacto escénico en la naturaleza (AETCO-AT, 2001).

2.6 Contaminación por metales pesados

Los metales pesados conocidos con este nombre por su alta densidad son: mercurio con 13.1 g/cm^3 , talio 11.85 g/cm^3 , plomo 11.3 g/cm^3 , cadmio 5.7 g/cm^3 , arsénico 2.7 g/cm^3 , Aluminio 2.70 g/cm^3 y berilio $1,85 \text{ g/cm}^3$. Son considerados tóxicos para el hombre y también presentan un problema serio al ecosistema, ya que algunos de sus compuestos son solubles en agua o bien son depositados en suelos. Estos metales pesados normalmente se encuentran en la naturaleza en la corteza terrestre en forma de sales. Cuando estas concentraciones son modificadas por actividades antropogénicas, las concentraciones se modifican y empiezan a generar un desequilibrio ecológico en el agua, suelo y aire. (ATSDR, 2007)

Algunos metales pesados (Cd^{+2} , Hg^{+2} y Pb^{+2}) tienen una relación carga/masa baja y se les considera ácidos de Lewis blandos que se unen a bases blandas que actúan sobre bases de cisteína en las proteínas con radicales RS^- estableciendo de esta manera su toxicidad en los seres vivos. También dependiendo de las condiciones óptimas de acidez o basicidad, sustituyen a otros cationes tales como el zinc en algunas proteínas, el calcio en los huesos y en actividades celulares donde hay intercambio iónico en las membranas de las células, inhibiendo el metabolismo y funciones normales a nivel celular. El arsénico es uno de los elementos más tóxicos conocidos, niveles altos de Arsénico pueden causar la muerte (ATSDR, 2007).

2.7 Contaminación por desperdicios mineros.

La actividad antropogénica en la industria minera promueve diferentes alteraciones en la superficie de la tierra así como en el agua y aire. Estas alteraciones inician desde el movimiento de tierras en la corteza terrestre, las cuales pueden ser superficiales o subterráneas.

Los residuos que son generados en el proceso de extracción de los minerales a los cuales se le han agregado compuestos químicos se les llaman jales, los cuales inundan grandes áreas de terreno a cielo abierto. Los jales, suelen estar contaminados con metales pesados, cianuros y ácidos, los cuales cambian los parámetros naturales del suelo y el agua.

En la actualidad los residuos mineros representan un problema y a través del tiempo se han acumulado en diferentes lugares del mundo y aún continúan contaminando el medio ambiente. Algunos autores consideran las actividades mineras como la número uno en contaminación ambiental a nivel mundial (Cardamone y col, 1984). Países desarrollados de Europa y aún en Estados Unidos de América, han iniciado la recuperación de aquellos sitios fantasmas no habitables contaminados por la industria minera. Estos sitios superan la normatividad existente para Europa y Estados Unidos de América de 400ppm para áreas de juego (EPA, 2001).

2.8 Contaminación por plomo

El plomo se encuentra en la corteza terrestre en pequeñas cantidades (0.002%) como galena (PbS), cerusita (PbCO₃), y anglesita (PbSO₄), el plomo como elemento tiene una masa molecular de 207.21 funde a 327.4°C y a 600°C produce muchos vapores. El plomo es anfótero de valencia +4 y +2, y forma compuestos con ácidos y bases formando óxidos, sales inorgánicas y orgánicas. El plomo se encuentra ampliamente distribuido en el agua, suelo agua y aire y sus principales fuentes de contaminación son la minería, los procesos industriales y la quema de combustibles. El plomo por sus características físicas y químicas se utiliza en la fabricación de baterías en los acumuladores de automóviles, en casi el 50% de su producción total; también es utilizado en metalúrgica, en recubrimientos de cables, cerámicas, pinturas anticorrosivas, vidrio, cosméticos, y en la industria militar (ATDSR, 2007).

2.9 Contaminación del agua por plomo

La contaminación de plomo soluble en agua natural es muy baja, puesto que forma sales insolubles con varios aniones, a pH neutro-ácido (ligeramente ácido) la adsorción sobre partículas minerales y orgánicas es el principal mecanismo de eliminación del plomo en las aguas naturales. En medios alcalinos, el plomo precipita como carbonato mientras que en medios reductores se forman sulfuros insolubles. Estas sales insolubles del plomo constituyen una reserva de plomo, cuando el medio cambia a ácido debido a los procesos de hidrólisis de los aniones, se forma un equilibrio permitiendo que haya una solubilidad de las sales de plomo (Domenéch y Parra, 2006). La contaminación por plomo puede llegar al suelo y agua por las actividades mineras, por los tipos de industria donde utilizan plomo y por quema de combustibles fósiles, la lluvia arrastra los contaminantes del suelo y los lleva hasta los ríos, cuencas, lagos y mares, donde encuentran flora y fauna acuática y terrestre los cuales bioacumulan el plomo entrando a la cadena alimenticia hasta llegar a los mamíferos superiores y al hombre. Cuando los mantos acuíferos llegan a ser contaminados por sales de plomo o por las tuberías de transporte de agua también llegan a ser una fuente de contaminación por vía oral para el hombre. Los peces y crustáceos son organismos que tienden a bioacumular al plomo y constituyen una fuente importante de alimentación para el ser humano (Córdoba y Hernández, 2006).

Los cuerpos de agua superficiales como los ríos, son una trampa de acumulación para los compuestos del plomo. Los compuestos insolubles son concentrados en los sedimentos o en las partículas en suspensión, estos compuestos son favorecidos con un pH básico. Las plantas acuáticas también acumulan plomo, la oxidación bioquímica de las sustancias orgánicas es inhibida por concentraciones de plomo superiores a 0.1 mg/L. La fauna disminuye con concentraciones superiores a 0.2 mg/L, el umbral de toxicidad para los peces es de 0.3 mg/L en truchas y peces blancos (DVGW, 1996).

El agua subterránea puede contaminarse por compuestos de plomo hidrosolubles como el cloruro de plomo y el nitrato de plomo, es conocido que el agua potable aún es conducida en tuberías de plomo en instalaciones antiguas y municipales de casas sobre todo en países del tercer mundo, formando depósitos de carbonatos de plomo en las paredes de las tuberías (ATSDR, 2007).

2.10 Contaminación del suelo por plomo

Hay evidencias que indican que en los sedimentos pueden ocurrir procesos de bio-metilación del plomo para generar tetrametil-plomo, el cual se propaga hacia zonas superficiales donde una parte se fotoliza y la otra escapa hacia la atmósfera y termina por descomponerse por la acción de la luz del sol. Al igual que el mercurio, el plomo se libera como plomo metálico y se oxida formando partículas de óxido de plomo o se adsorbe sobre otras partículas minerales.

En el suelo el plomo está fuertemente retenido por el humus sobre todo si contiene grupos sulfidrilos (-SH), o por las fases sólidas arcillosas en donde se adsorbe químicamente. No obstante a pH neutros-ligeramente alcalinos la mayor parte del plomo se encuentra precipitado como carbonato, hidróxido, sulfuro o fosfato. A pH alcalinos la solubilidad aumenta debido a la formación de complejos solubles con compuestos orgánicos naturales e hidroxocomplejos. La gran afinidad del plomo por el humus hace que al igual que el mercurio se acumule en los horizontes superficiales del suelo (Domenéch y Parra, 2006).

2.11 Efectos toxicológicos del plomo en anfibios.

Los compuestos insolubles del plomo en los cuerpos de agua superficiales se precipitan y acumula pasando a los sedimentos, plantas acuáticas y arcillas. La contaminación del agua en general puede afectar las poblaciones acuáticas dependiendo del tipo y concentración del agente tóxico, van desde la inhibición y el adecuado funcionamiento del organismo hasta la alteración de las afectaciones que se pueden observar en sus metabolismos, funciones vitales niveles celulares y en ocasiones la muerte. La contaminación por plomo está presente en sedimentos y vegetales. El plomo es muy insoluble en el agua excepto cuando está en forma de nitrito de plomo o acetato de plomo, aunque condiciones ácidas favorecen la incorporación al agua como cloruro de plomo. Los anfibios fueron los primeros animales vertebrados en adaptarse a una vida semiterrestre. Se estima que surgieron de los peces hace unos 360 millones de años. Con el transcurso del tiempo, de ellos se desarrollaron los reptiles que a la vez dieron lugar a los mamíferos y las aves, más tarde surgieron los anfibios que han logrado sobrevivir hasta el presente. A diferencia de los vertebrados, los anfibios se distinguen por sufrir una transformación total durante su desarrollo, a este cambio se le llama metamorfosis la cual consiste en un cambio principal desde el estado de larvario, pasando por renacuajo hasta el de adulto. Se asocia con la preparación de un organismo acuático para una existencia principalmente terrestre. En el ciclo vital típico de un anfibio los huevos, tras una fecundación externa, son depositados en el agua. La larva emerge del huevo y puede nadar y respirar bajo el agua. Presenta branquias, cola y una boca circular. Crece sin mayores cambios hasta que completa su desarrollo. Se estima que unas 4300 especies diferentes de anfibios viven hoy en día. Todas estas especies se clasifican en tres grupos básicos, cecílicos, salamandras, el último lo integran ranas y sapos. Durante la transformación o metamorfosis las aletas se desarrollan en patas, la cola desaparece, y la respiración se vuelve pulmonar. Sufriendo aún más cambios internos no tan fáciles de apreciar a simple vista (Jiménez y Jiménez, 2003).

Las ranas se están enfrentando a retos de supervivencia más difíciles porque su hábitat está disminuyendo con el incremento de la población y actividades humanas, incluyendo la contaminación química; cuando hay mayor radiación solar los rayos ultravioleta penetran directamente a los cauces de agua afectando su desarrollo. Otro aspecto es la tala de árboles y la destrucción de la capa de ozono que está afectando a estos hábitats donde viven y se desarrollan los anfibios. Altas concentraciones de plomo en el agua pueden afectar el desarrollo de las ranas desde su estado embrionario hasta alcanzar la juventud. Desde hace 60 años se han detectado en todo el mundo ranas con deformidades físicas. Actualmente en Estados Unidos de América, se han detectado en 38 estados del país, ranas con diferentes tipos de deformidades, en algunas zonas se han llegado a detectar hasta la mitad de la población de ranas con deformidades las cuales incluyen, ranas sin extremidades posteriores, o con un mayor número de éstas, falta de extremidades, y miembros en el vientre (Hogan, 2004). Existe una gran incertidumbre en la comunidad científica porque en diferentes lugares del mundo se están presentando estos casos. Algunos autores lo atribuyen a la contaminación ambiental química de sus hábitats, otros autores indican que es una mezcla de factores que incluye los contaminantes, la tala y deforestación, así como la incidencia de luz ultravioleta en el desarrollo embrionario de estos organismos. También existe la posibilidad de que un parásito esté causando estas deformidades, se cree que el trematodo riberoria entra al cuerpo de la rana causando este tipo de deformaciones; algunas de ellas son presentadas en las figuras 2.2 y 2.3. Estudios recientes han demostrado que las ranas tienen deformidades por una depredación natural selectiva que realiza el dragón volador en la etapa de metamorfosis a los renacuajos (Ballengee y Sessions, 2009).

La ranita arborícola (*Ecnomiohyla myotimpanum*) es una especie nativa que se establece en el Río Escanela, pudiera estar siendo afectada por todos estos factores de contaminación ambiental. Esta especie fue considerada en el año 2004, en la lista roja de las especies en peligro de extinción por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.



Figura 2.2 Anormalidades en ranas arborícolas del pacifico de la especie *Hyla regilla*, por contaminación de agua de Corvalo Oregon USA. Fotografías realizadas por Frans Lanting, 2005

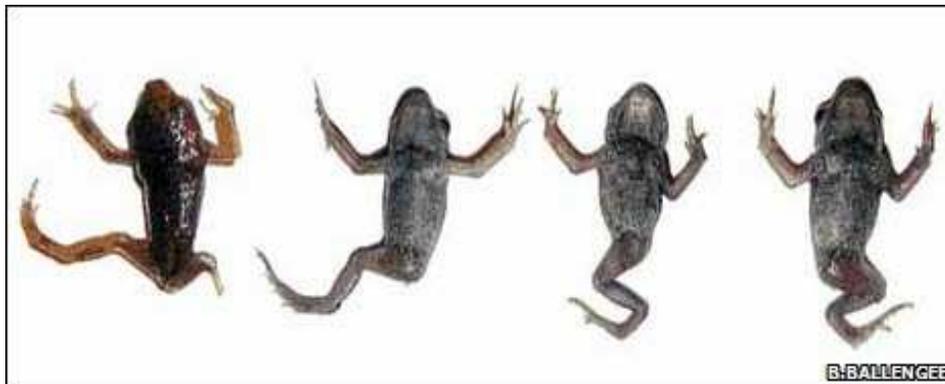


Figura 2.3. Crecimiento atrofiado en ranas seleccionadas de ríos y lagos de Yorkshire en Reino Unido. Fotografías realizadas por Brandon Ballengee, 2009.

2.12 Normatividad.

La normatividad en México para actividades mineras es muy limitada, sin embargo podemos incluir algunas de las siguientes normas mexicanas que nos sirvieron de referencia. La NOM-001- ECOL-1996 (2003), es para agua y establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las aguas de descarga de aguas residuales y bienes nacionales. Otra norma para agua es la NOM-002- ECOL- 1996 (2003), la cual establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. Para el agua potable, aplica la NOM 127 SSA1:1994 (2000) salud ambiental, agua para uso y consumo humano - límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Esta norma establece los límites para el agua potable, y los tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Finalmente para suelos, se tiene la norma, NOM-147 SEMARNAT-SSA1:1994 (2007).

La norma NOM-147, establece los criterios para determinar concentraciones de remediación de suelos contaminados con arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, plomo, níquel, plata , selenio, talio y vanadio. Los límites máximos permisibles de acuerdo a estas normas se presentan en el cuadro 2.2. Algunos valores de toxicidad de compuestos de plomo para diferentes individuos son presentados en el cuadro 2.3. Un estudio realizado para embriones de la rana *Bufo arenarum*, nos indica que con una concentración de 30mg/L de Plomo, hay una mortandad del 50% de la población en un tiempo de 72 horas, además de mostrar una disminución en el desarrollo y curvaturas en la espina dorsal. En otra concentración de plomo de 10-20 mg/L, en un tiempo de 96 horas los embriones sobreviven al 100% pero en el 96.6% de ellos hay retraso en el desarrollo (Sandoval y col., 2004).

El cuadro 2.4 muestra diferentes niveles de concentración de plomo que por norma manejan diferentes instituciones gubernamentales o independientes en los Estados Unidos de América. Estudios realizados en organismos animales, seres humanos incluyendo niños y mujeres embarazadas, considerando diferentes aspectos en las zonas de riesgo en lugares habitables cercanos a fuentes de contaminación por plomo, alimentación y análisis de sangre, así como áreas de trabajo incluyendo alimentos, agua y situaciones de suelos han demostrado que el plomo tiene riesgo de intoxicación en los seres vivos. Estos estudios han llevado a los diferentes países a tomar medidas preventivas y se han establecido valores normativos cada vez más bajos en aire, agua y suelo.

Cuadro 2.2. Límites máximos permisibles de metales pesados en normas mexicanas. Valores en negritas indica la concentración límite para el plomo

Descarga de aguas residuales y bienes nacionales					
NOM-001 - ECOL-1996, 2003	Metales	ríos Protección vida acuática		suelo en humedales naturales	
		Promedio Mensual, en mg/L	Promedio Diario, en mg/L	Promedio Mensual, en mg/L	Promedio Diario, en mg/L
	Hg	0.005	0.01	0.005	0.01
As	0.1	0.2	0.1	0.2	
Cd	0.1	0.2	0.1	0.2	
Cr	0.5	1.0	0.5	1.0	
Zn	10	20	10	20	
Pb	0.5	1.0	0.2	0.4	
Descarga de aguas a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal					
NOM-002- ECOL- 1996, 2003	Metales	Promedio Mensual, en mg/L	Promedio Diario, en mg/L	Instantáneo, en mg/L	
	Hg, total	0.01	0.015	0.020	
	As	0.5	0.75	1.0	
	Cd	0.5	0.75	1.0	
	Cr, hexavalente	0.5	0.75	1.0	
	Zn	6.0	9.0	12.0	
	Pb total	1.0	1.5	2.0	
Metales en agua potable					
NOM 127 SSA1 :1994, 2000	Hg	0.001 mg/L			
	As	0.025 mg/L			
	Cd	0.005 mg/L			
	Cr	0.05 mg/L			
	Zn	5.0 mg/L			
	Pb	0.01 mg/L			
Remediación de suelos por metales pesados					
NOM-147 SEMARNAT-SSA1, 2007	Contaminante, en mg/Kg base seca	Uso Agrícola / Residencial, en mg/Kg base seca		Uso Industrial, en mg/Kg base seca	
	Hg	23		310	
	As	22		260	
	Cd	37		450	
	Cr, hexavalente	280		510	



Pb

400

800

Cuadro 2.3. Toxicidad en organismos por compuestos de plomo

Individuo	Dosis aplicada	Referencia
Ratas	DL ₅₀ 100-825 mg/Kg, oral (arseniato de plomo)	
Conejos	DL ₅₀ 125 mg/Kg, oral (arseniato de plomo)	DVGW, 1985
Pollos	DL ₅₀ 450 mg/Kg, oral (arseniato de plomo)	
Perros	DL ₁₀₀ 2000–3000 mg/Kg oral (sulfato de plomo)	
Pececillos de río americano	CL ₅₀ 6.7 – 10.5 mg/L, (24hr) (cloruro de plomo)	OMS, 1989
Peces	Letal 1.4 mg/L (tetra etilo de plomo)	UBA, 1986
Trucha arcoíris	CL ₅₀ – 1.17 mg/L, (96hr) (nitrato de plomo)	OMS, 1989
Pulgas acuáticas	CL ₅₀ – 0.45 mg/L, (48hr) (cloruro de plomo)	OMS, 1989
Embriones de rana de la especie <i>Bufo arenarum</i> (<i>sapo común</i>)	CL ₅₀ – 30 mg/L, Pb en (72 hr.).	Sandoval y col., 2004

Cuadro 2.4. Guías médicas y ambientales para la toxicidad del plomo

Agencia	Concepto	Concentración	Comentarios
CDC ¹	Sangre	10 µg/dl	Asesoría; nivel para manejo individual
OSHA ²	Sangre	40 µg/dl 60 µg/dl	- causa para notificación escrita y examen médico - causa para la remoción de la fuente de exposición por razones médicas
ACGIH ³	Sangre	30 µg/dl	indica la exposición en el Valor Umbral Límite (TLV)
OSHA	Aire (lugar de trabajo)	50 µg/m ³ 30 µg/m ³	- Límite de Exposición Permisible (PEL) de 8 horas en promedio (Industria general) - Nivel de acción
EPA ⁴	Aire (ambiente)	0.15 µg/m ³	Estándar Nacional de Calidad de Aire Ambiental, NAAQS; promedio de 3 meses
EPA	Suelo (residencial)	400 ppm (para áreas de juego) 1200 ppm (áreas de no juego)	Guía, análisis de plomo en suelo; requerimiento aplicable solamente a los proyectos financiados con fondos federales (40 CFR Parte 745, 2001)
EPA	Agua (de bebida)	15 µg/L 0 µg/L	Nivel de acción para suministros públicos

Fuente: ATSDR 2007

1. Centro de control de Enfermedades.
2. Agencia de seguridad y salud ocupacional
3. Conferencia americana de gobierno para la higiene industrial.
4. Agencia de protección ambiental en USA.

2.13 Genotoxicidad.

El daño inducido en el material genético no solo incluye al ADN, sino también a componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula por ejemplo las proteínas que intervienen en la reparación, condensación y des-condensación del ADN en los cromosomas. Los agentes capaces de ocasionar toxicidad genética son llamados genotóxicos o xenobióticos y se clasifican en tres categorías de acuerdo a su origen: químicos (compuestos), físicos (radiaciones) y biológicos (bacterias, parásitos, hongos y virus). La acción o capacidad de inducir daño de estos agentes está influida por la dosis recibida y el tiempo o vía de exposición, junto a la constitución genética del individuo que puede definir una susceptibilidad propia o particular. Los genotóxicos también se clasifican en mutágenos que implican alteraciones en un gen o cromosomas, los teratógenos en daño inducido sobre el organismo en desarrollo y los carcinógenos en transformación celular (Abrevaya, 2008).

2.13.1 Ensayo cometa.

El ensayo del cometa o el ensayo de electroforesis unicelular es un método rápido, sensible y relativamente simple para detectar el daño del ADN en el nivel de células individuales (Singh y col., 1988). Combina la simplicidad de las técnicas bioquímicas para la detección de roturas del ADN de cadena sencilla. Este método se introdujo por primera vez por Ostling y Johanson en 1984, fue un ensayo en el que se realizó la lisis y la electroforesis en condiciones neutras, con tinciones de naranja de acridina. La imagen obtenida se parecía a un "cometa" con una cabeza clara de ADN intacto y una cola, que consta de piezas dañadas o rotas de ADN de ahí el nombre "ensayo cometa".

El ensayo del cometa se basa en la capacidad de fragmentos de carga negativa de ADN, los cuales son separados a través de un gel de agarosa en respuesta a un campo eléctrico. La longitud de alcance de la migración del ADN depende directamente del daño en el ADN presente en las células. Las lesiones del ADN consiste en saltos de línea después del tratamiento con álcalis ya sean solos o en combinación con ciertas enzimas, aumenta la migración del ADN (Tice y col., 2000). En este ensayo, una suspensión de células se mezcla con agarosa de bajo punto de fusión y se extendió en portaobjetos de vidrio de microscopio. Después es colocado en una solución de lisis donde las células de ADN tienden a relajarse, los portaobjetos son colocados en una solución alcalina a pH mayor a 13 y la electroforesis se lleva a cabo.

La reversión del ADN y la electroforesis a pH neutro (7-8) sobre todo facilita la detección de roturas de doble cadena y enlaces cruz y electroforesis a un pH de 12.1 a 12.4 facilita la detección de roturas de cadena sencilla y doble y la electroforesis a un pH superior al 12,6 expresa sitios álcali lábil (ALS), además de todo tipo de lesiones mencionadas anteriormente (Miyamae y col., 1998). Al ser sometido a un campo eléctrico el ADN migra fuera de la célula, en la dirección del ánodo que aparece como un "cometa". El tamaño y la forma de la cometa y la distribución de ADN en el cometa se correlacionan con el grado de daño en el ADN (Fairbairn y col., 1995).

El ensayo cometa presenta ventajas como ser una técnica no invasiva, requiere menos de 10 000 células, recolecta datos de células individuales, contando de 50 a 100 células por individuo y a través de un software de análisis computarizado, el cual proporciona una robustez estadística. Es utilizada muy poca cantidad de muestra de sangre de 5 a 10 μ l y los resultados son obtenidos en pocas horas.

2.14 Espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción

Este método de espectrometría de masas con plasma acoplada por inducción (ICP-MS), fue desarrollado en los años 1980's para determinar bajos límites de detección de los elementos. El resultante de esta combinación fue la capacidad de análisis de multi-elementos en una muestra con una precisión de partes por trillón. El ICP-MS combina alta temperatura (ICP) con un espectrómetro de masas, la fuente del ICP, convierte los átomos de los elementos en iones. Estos son separados y detectados por el espectrómetro de masas (Wolf, 2005). El ICP-MS ha sido usado ampliamente a través de los años, encontrando múltiples aplicaciones en diferentes campos de la ciencia, tales como medicina, seguridad, farmacia, manufactura y en diferentes tipos de industria, algunas relacionadas al medio ambiente, tales como análisis de aguas, suelos, sedimentos y en análisis de animales incluyendo la determinación de metales pesados.

HIPÓTESIS

El plomo proveniente de la actividad minera realizada en la ribera del Río Escanela induce genotoxicidad en renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la presencia de plomo en agua, sedimentos y renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum* del Río Escanela y su efecto genotóxico.

Objetivos Particulares

1. Cuantificar la concentración de plomo en agua, sedimentos y renacuajos en un transecto del Río Escanela por espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción (ICP-MS).
2. Determinar el efecto genotóxico en renacuajos del Río Escanela por electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa).

III. METODOLOGÍA

3.1 Sitio de estudio.

El Río Escanela se encuentra en ubicados en las siguientes coordenadas geográficas: N 21° 11'58.76'', O 99° 36'24.40 a 1409 msnm. En el sitio fueron seleccionados 6 puntos como se indica en la figura 3.1 El muestreo se llevó a cabo durante 5 fechas en el 2008 en época de estiaje.

Las fechas de muestreo fueron, fecha A 11 de abril, B 18 de abril, C 3 de mayo, D 24 de mayo y E 24 de junio 2008. Los puntos de muestreo son Identificados P4, P5 y P6 como puntos río arriba de la mina y los puntos P1, P2, y P3 como puntos río abajo de la mina. Los puntos río arriba de la mina son: P4 (-300m) nombrado el árbol, es un lugar de baja profundidad aproximadamente de 30 a 40 centímetros con una anchura de aproximadamente 10 metros de ancho con poco sedimento con flujo de agua constante. El P5 (-200m) nombrado la tinaja, es un lugar con casi 1 metro de profundidad y un ancho aproximado de 3 metros en forma de alberca con mucho sedimento. El P6 (-100m) nombrado el rebaño es un lugar angosto, también con muy poca profundidad 30 cm aproximadamente y con muy poco sedimento principalmente en las orillas del río, con mayor flujo de agua por lo angosto del terreno. Este punto tiene la particularidad de existir un corral de chivos como a unos 4 a 6 metros de distancia, sobre la ladera del río. El punto P1 (+50m) nombrado la mina, es el lugar más cercano a la mina aproximadamente 50 metros río abajo, en este lugar hay un puente en el que por encima de él, pasan los camiones con el mineral extraído de la mina. En este lugar hay 2 pozas divididas por una columna que soporta el puente. En este lugar la comunidad lava ropa con jabón y también la usan para bañarse, hay mucho sedimento en las dos pozas.

El punto P2 aproximadamente a 150 metros de la mina se encuentra otro puente peatonal, en este punto es donde se encontraron los peces con deformación en la espina dorsal por el Grupo de la Sierra Gorda A.C. Este punto tiene una profundidad de 2 a 3 metros en su parte más profunda, es muy ancho aproximadamente 6 a 8 metros, este lugar tiene mucho sedimento y viven muchos renacuajos.

El último punto P3 a 250 metros aproximadamente río abajo, es poco profundo y con poco sedimento. Los muestreos fueron de abril a junio y los volúmenes de agua en el río fueron variando de más en abril a menos en mayo que llegó la época de sequía. En el último muestreo el 24 de junio, de acuerdo a los habitantes en esta fecha ya se había tenido la primera lluvia de la temporada y el río fluía muy similar a la fecha de muestreo del 11 de abril de 2008. Esta primera lluvia de la temporada contribuye al arrastre de hojas y sedimento al cauce del río y de todo lo que encuentra a su paso sobre la corteza terrestre del lugar. Los sitios son presentados en la figura 3.2.

3.2 Renacuajos.

3.2.1 Muestreo de renacuajos.

Las muestras fueron obtenidas en recipientes plásticos limpios y secos, con agujeros de ventilación en la tapa, estos fueron rotulados para cada punto de muestreo, y con una la letra para cada fecha de muestreo, en cada fecha de muestreo fueron capturados 10 renacuajos, con un promedio de 1cm de cabeza; fueron colocados en recipientes con agua y un poco de sedimento del mismo punto, dejando una cámara de aire en el recipiente y tapando el recipiente. La tapa tenía perforaciones para evitar ahogamiento. El número de renacuajos capturados fueron 60 para cada fecha de muestreo.

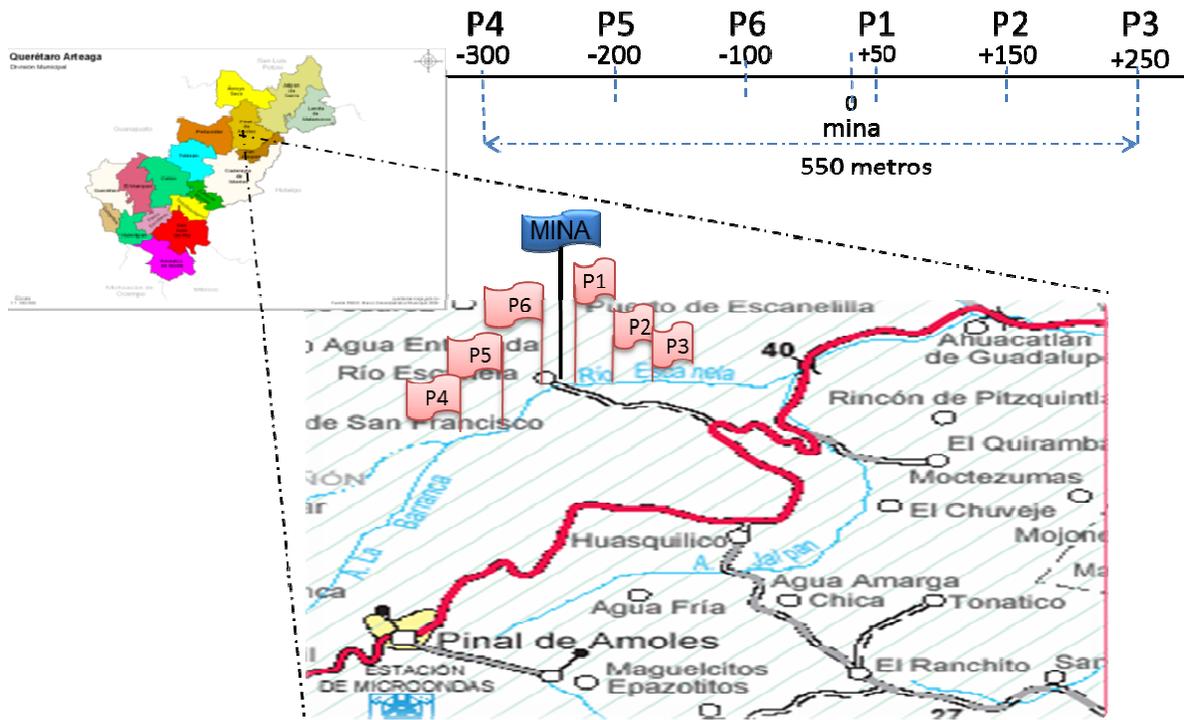


Figura 3.1 Puntos de muestreo de agua, renacuajos y sedimentos en el transecto seleccionado en el Río Escanela



P4(-300m) – el árbol



P1(+50) – la mina



P5 (-200m) – la tinaja



P2 (+150m) – el puente



P6(-100m) – el rebaño



P3 (+250m) – las cabañas

Figura 3.2 Puntos de muestreo ilustrativos

3.2.2. Obtención de sangre de renacuajos.

En una placa escavada de porcelana se colocaron 3µl de heparina. Se tomó una muestra de 5µl de sangre de la vena caudal de tres renacuajos y se mezcló con la heparina. Posteriormente la mezcla se colocó en un tubo eppendorf que contenía 1ml de solución Buffer de fosfatos, y se mantuvo a 4°C, hasta su posterior análisis. Esta operación se repitió para 5 renacuajos.

3.2.3 Preparación de laminillas

Cada una de las muestras de sangre fue centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm y se les retiró el sobrenadante. Al botón obtenido se le adicionaron 180 µl de agarosa de bajo punto de fusión (BPF), se tomaron 90 µl y se colocaron en una laminilla que contenía previamente una capa de agarosa de punto normal de fusión (PNF). Fueron colocados en una superficie fría (4°C) para solidificación, posteriormente se retiró el cubreobjetos (segunda capa de agarosa) y se colocó una tercera capa de agarosa de BPF, se dejó solidificar y se elaboraron dos laminillas por renacuajo.

3.2.4 Electroforesis unicelular alcalina.

Las laminillas que contenían las muestras se colocaron en una solución de lisis (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM; pH 10-10.5; Tritón X-100 al 1% y DMSO al 10%) fría a 4°C por 24 horas. Posteriormente las preparaciones fueron removidas de la solución de lisis y colocadas en la cámara de electroforesis (equipo BIO-RAD, POWER PAC UNIVERSAL), la cual fue llenada con buffer alcalino recién preparado (NaOH 300 mM y EDTA 1mM con pH > a 13) se dejaron en la cámara por 20 min, para permitir el

desdoblamiento del ADN y la expresión de los sitios álcali-lábiles. Posteriormente, se realizó la electroforesis por 20 minutos (300 mA y 25 V).

Las preparaciones fueron colocadas en posición horizontal y enjuagadas tres veces (5 minutos cada una) con buffer Tris 0.4M, para neutralizar el exceso de álcali. Finalmente, cada preparación fue teñida con 70 μ l de bromuro de etidio (2 μ g/ml), y analizadas con un microscopio de epifluorescencia (equipo AXIOSKOP 40-ZEISS, 40X). De cada laminilla se leyeron 50 células por cada preparación y posteriormente se analizaron con el software comet, para evaluar el daño al ADN.

3.3. Muestreo de sedimento

Para recolectar el sedimento fueron utilizadas bolsas tipo ziploc con cierre hermético, rotulado con el número del punto de muestreo y la fecha, aproximadamente 500 gramos sedimento fueron recolectados del fondo del río en cada punto. Las muestras fueron llevadas al laboratorio para su posterior análisis, ver figura 3.4.

3.4 Muestreo de agua

Las muestras se colocaron en recipientes plásticos de 100 ml nuevos, color ámbar y rotulados en la tapa, con letra de fecha y número del punto de muestreo. En cada punto se enjuago cada recipiente y se llenó casi completamente y se le adicionaron 0.5 ml de ácido clorhídrico grado reactivo, las muestras fueron colocadas en una hielera para su traslado al laboratorio, se almacenaron en un refrigeración (5°C), hasta realizar el análisis en el ICP-MS. La medición de las muestras de plomo, en agua, sedimentos y renacuajos se llevó a cabo por el método de ICP-MS, en el instrumento Thermo Electron Corp. modelo X Series^{II}, acoplado a un automuestreador CETAC ASX-510.

3.5 Descripción de la Metodología.

3.5.1 Metodología del análisis de electroforesis unicelular alcalina.

Fueron seleccionados 6 puntos de muestreo y 5 fechas de recolección de muestras (A, B, C, D y, E). En cada punto fueron recolectados al menos 10 renacuajos y se llevaron a laboratorio, en donde fueron seleccionados 3 renacuajos para la obtención de la 5µl/renacuajo y fueron preparadas 2 laminillas por renacuajo. A un grupo de 16 laminillas se les realizó la electroforesis unicelular alcalina, después fueron observadas 50 células por laminilla y fotografiadas, los resultados fueron procesados en el Software Comet ver figura 3.3

3.5.2 Metodología del análisis de ICP-MS.

En las fechas seleccionadas (A, B, C, D y, E) en cada punto fueron recolectados 10 renacuajos, 250g de sedimento y 100 ml de agua. Al agua se le adicionaron 0.5 ml de HCl grado reactivo y fue refrigerada a 4°C hasta su análisis por ICP-MS.

Las muestras de sedimentos y renacuajos fueron secadas por 48 horas, posteriormente molidos y cribados en malla 200. Se pesó una cantidad de 0.05g y se le adicionaron 1ml de HF y 5 ml de HNO₃ y se introdujeron en un horno de microondas para realizar la digestión, se dejaron enfriar las muestras por 12 horas y se filtraron. Después fueron obtenidos los nitratos al adicionar 16 gotas de HNO₃ y se calientan por 24 horas en parrilla para eliminar los fluoruros, finalmente se agregaron 2 ml HNO₃ y 2 ml de agua con una resistividad de 18.2 mili-ohm/cm de resistividad. Fueron seleccionados 4 estándares internos a los cuales se les agregó la muestra problema y fueron medidos en el equipo de ICP-MS (Thermo Electron X Series^{II}) con una corriente de 1200 Watts y con un flujo de gas enfriador de 14.59 l/min, con un gas auxiliar de 0.90 l/min, gas de nebulización 0.78 l/min y realizadas un total de 45 réplicas ver figura 3.4.



Figura 3.3. Diseño del experimento para determinación del daño genotóxico

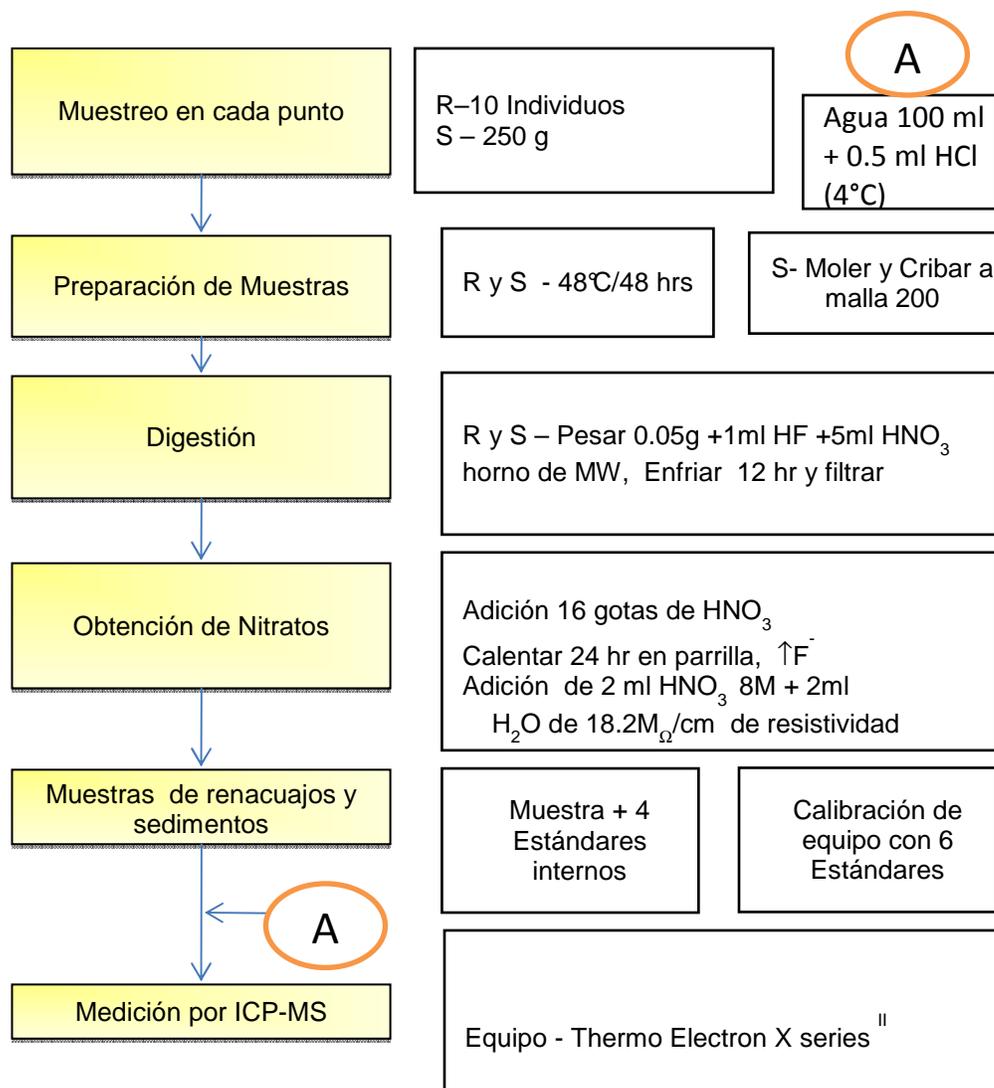


Figura 3.4 Diseño del experimento para el análisis de plomo en agua, sedimentos y renacuajos, por ICP-MS. R significa renacuajos, S sedimentos y A agua.

3.6 Análisis estadístico.

En este estudio fue utilizado el método Tukey y Kramer para realizar la comparación de medias de datos entre los diferentes puntos de muestreo y fechas para comparar el daño genotóxico entre los puntos y entre grupos de datos de río arriba y río abajo. Los parámetros evaluados fueron la longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda.

IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos por ICP-MS, para agua, renacuajos y sedimentos son mostrados en el cuadro 4.1. Los siete metales resultantes con una concentración mayor en el análisis fueron cromo, cadmio, plomo, zinc, cobre, litio y fierro. Los metales pesados cromo, cadmio y plomo son considerados de riesgo ambiental (ATDSR, 2007). El metal de mayor concentración en río arriba y río abajo fue el plomo, confirmando los estudios preliminares que el plomo se encuentra en este lugar en la corteza terrestre con una proporción mayor (cuadro 4.1.).

4.1 Plomo en agua.

En la figura 4.1 se presentan los resultados obtenidos para agua por punto de muestreo a través de todas las fechas, indicando que los valores abajo de la mina para las fechas A y B (11 y 18 de abril) son los de mayor concentración. En las fechas C, D y E (3 y 24 de mayo, 24 de junio respectivamente), no hay grandes diferencias entre todos los puntos; en el punto 2 el volumen de agua es muy estable y es el de mayor profundidad, el punto 3 es de poca profundidad con mayor volumen de agua en las fechas de 11 y 18 de abril y 24 de junio (fechas A, B y E respectivamente).

Cuadro 4.1 Concentración promedio de metales en el Río Escanela detectados por ICP-MS. Los valores en negritas indican la comparación entre el plomo, respecto a los metales cadmio y cromo.

	Punto	Valores promedio = \bar{x} , (En cada punto n=5, excepto al promediar los puntos n =15)						
		Cr	Cd	Pb	Zn	Cu	Li	Fe
Agua, ($\mu\text{g/L}$)	P4 (-300m) ^a	0.56	0.04	0.72	4.87	0.65	0.57	8.54
	P5 (-200m) ^a	0.67	0.11	1.20	9.69	0.81	0.68	10.27
	P6 (-100m) ^a	0.69	0.25	1.57	6.86	0.37	0.77	10.49
	P1(+50m) ^b	0.52	0.13	4.52	8.87	1.18	0.60	7.91
	P2(+150) ^b	1.08	0.11	11.18	15.86	28.72	0.85	16.40
	P3(+250) ^b	1.64	0.14	12.04	14.79	1.17	0.92	24.92
	P456 ^c (n=15) ^a	0.64	0.13	1.19	7.14	0.61	0.67	9.77
	P123 ^c (n=15) ^b	1.08	0.13	9.25	13.17	10.36	0.79	16.41
Renacuajos, en (mg/kg)	P4 ^a	1.04	0.48	14.54	72.83	22.60	0.76	621.50
	P5 ^a	2.45	10.00	32.43	267.60	119.80	0.89	1366.39
	P6 ^a	1.39	1.85	114.22	268.24	80.26	0.73	1182.12
	P1 ^b	2.76	1.06	42.68	100.15	37.77	0.73	837.28
	P2 ^b	0.90	0.58	18.93	35.23	4.31	0.81	485.00
	P3 ^b	3.13	0.82	33.46	71.88	14.65	0.80	710.40
	P456 (n=15) ^a	1.63	4.11	53.73	202.89	74.22	0.80	1056.67
	P123 (n=15) ^b	2.26	0.82	31.69	69.09	18.91	0.78	677.56
Sedimentos, en (mg/kg)	P4 ^a	26.21	5.70	2005.99	355.11	56.26	12.47	3.15
	P5 ^a	26.00	6.26	2852.05	463.62	98.99	14.36	3.07
	P6 ^a	16.75	35.31	4191.20	1965.94	439.50	9.01	2.13
	P1 ^b	28.26	12.38	3122.74	722.09	122.00	15.31	3.61
	P2 ^b	41.15	11.59	2983.70	836.68	98.64	26.12	4.43
	P3 ^b	34.19	11.99	2298.70	697.94	82.38	19.64	3.98
	P456 (n=15) ^a	22.99	15.76	3016.41	928.22	198.25	11.95	2.78
	P123 (n=15) ^b	34.53	11.99	2801.72	752.24	101.01	20.36	4.01

a. Indica río arriba

b. indica río abajo

c. P456 significa el promedio de los puntos río arriba (P4, P5 Y P6). P123 significa el promedio de los valores río abajo (P1, P2 Y P3).

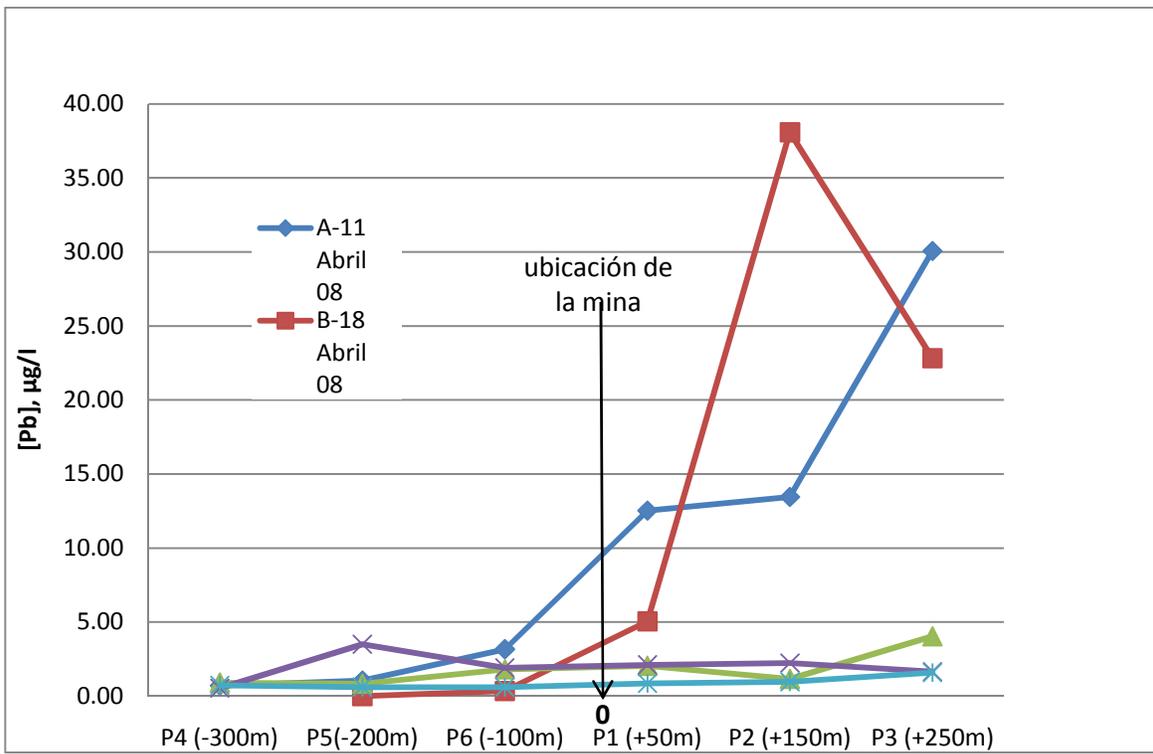


Figura 4.1 Concentración promedio de plomo en agua, en el transecto Río Escanela, por ICP-MS

En el cuadro 4.2 se muestran los valores promedio de un total de 5 datos (de 5 fechas de muestreo) obtenidos en el estudio de concentración de plomo en agua. Cada punto de muestreo es el resultado de una muestra por triplicado corrida por ICP-MS en cada fecha de muestreo. El objetivo de esta tabla es comparar verticalmente los valores medios entre cada punto entre las fechas. Por ejemplo en el punto P4 (-300m) el punto río arriba más alejado encontramos que no hay grandes diferencias entre los valores obtenidos, todos ellos son muy cercanos independientemente de la fecha. Este punto fue muy constante en volumen de agua y aparentemente no hay grandes alteraciones que afecten este punto. Sin embargo en los puntos P2 (+150m) y P3 (+250m) río abajo si hay diferencias considerables en los resultados entre las fechas. Las diferencias entre los promedios de los puntos río arriba y río abajo son considerables del orden de 1 a 9 veces. Lo que indica que los puntos río abajo de la mina están siendo más afectados en concentración de plomo en agua que los de río arriba. Si observamos las medianas obtenidas de datos río arriba y río abajo en el mismo cuadro las diferencias son un de 1 a 3.

En el cuadro 4.3, se realizó una comparación medias de concentración de plomo en agua en cada grupo río arriba y río abajo. En los puntos río arriba P4 (-300m), P5 (-200m) y P6 (-100m), fue realizada la comparación de medias entre ellos por el método de Tukey y Kramer, resultando que no hay diferencias estadística significativa entre ellos (la misma letra "a"). El mismo resultado se obtuvo en la comparación de medias por el mismo método en los puntos río abajo. Sin embargo al comparar los promedios de las medias de los puntos río arriba contra los puntos río abajo, si se mostraron diferencias estadísticas significativas (letras "a" y "b").

Cuadro 4.2. Concentración promedio de plomo en agua por ICP-MS. Hay diferencias

entre fechas, entre puntos y entre grupos de puntos. Números en negritas indican el valor más alto y el más bajo de concentración de plomo.

Fecha	Río arriba (µg/L)			Río abajo (µg/L)		
	P4 (-300)	P5 (-200)	P6 (-100m)	P1 (+50m)	P2 (+150m)	P3 (+250m)
A - 11 abril 08	0.71 ¹	1.05	3.17	12.53	13.45	30.07
B - 18 abril 08	--	0.01²	0.34	5.06	38.08²	22.83
C - 3 mayo 08	0.90	0.83	1.81	2.05	1.16	4.04
D - 24 mayo 08	0.54	3.51	1.92	2.12	2.23	1.66
E - 24 junio 08	0.73	0.61	0.61	0.85	0.97	1.59
\bar{x} , en µg/L (n=5) ³	0.72	1.20	1.57	4.52	11.18	12.04
$\bar{x}_{P456, P123}$, µg/L		1.19 (n=14)			9.25 (n=15)	
$Me^4_{P456, P123}$, µg/L		0.7785 (n=14)			2.23 (n=15)	
$Me_{P456123}$, µg/L, (n=29)	1.66					
$\bar{x}_{P456123}$, µg/L (n=29)	5.36					
σ^5 , toda la muestra n=29	9.41					

1. Cada valor es individual y es el promedio de una muestra analizada por triplicado por ICP-MS
2. Valores en negritas indican valor más bajo en P5 de fecha del 18 abril 2008 río arriba de la mina y el más alto en P2 del 18 de abril y el valor río abajo de la mina.
3. El valor de n=5 en todos los puntos, excepto en P4, n=4.
4. Me = es el valor de la mediana de la muestra.
5. La variación estándar es más alta que la media de datos.

Cuadro 4.3. Comparación estadística por el método de Tukey y Kramer de concentración promedio de plomo en agua. El primer grupo de valores río arriba resultaron con la misma letra "a", lo que indica que no hay diferencia estadística significativa, en río abajo dio el mismo resultado, mientras que al comparar los grupos de valores río abajo (a) contra los de río arriba (b), indicaron que si hay diferencia estadística significativa.

Referencia	Punto	Letra que indica si hay diferencia estadística significativa ¹	\bar{x} , $\mu\text{g/L}$ n=5 en cada punto excepto en P4, n=4
Río arriba	P4 (-300m)	a	0.72
	P5 (-200m)	a	1.20
	P6 (-100m)	a	1.57
Río abajo	P1 (+50m)	a	4.52
	P2 (+150m)	a	11.19
	P3 (+250)	a	12.04
Promedio río arriba, n=14	P123	a	1.20
Promedio río abajo n=15	P456	b	9.25

La comparación es por método es por Tukey y Kramer con $\alpha=0.05$.

En el cuadro 4.4 se presentan la comparación de las concentraciones promedio de plomo en agua río arriba, río abajo y el promedio de todos. En la misma forma se calculó la mediana de los grupos de datos de los puntos río arriba, de río abajo y de todo el grupo. La comparación contra los valores máximos permisibles indica que en ninguno de los casos superaron los niveles máximos permisibles para agua en las normas NOM 001, NOM 002, y la NOM 127.

En los puntos P2 (+150m) y P3 (+250m) fueron detectadas actividades humanas tales como la explotación de la mina, actividades domésticas de lavado de ropa con uso de detergentes, actividades de ganadería y de turismo; sin embargo los valores obtenidos, no superaron los límites permisibles para humedales y ríos con protección de vida acuática. Estos resultados indican que el agua del Río Escanela en el transecto muestreado no supera los niveles máximos permisibles para ríos y humedales; sin embargo se podría considerar un mayor número de análisis para la caracterización del agua.

Cuadro 4.4 Comparación de valores promedio de concentración de plomo en agua contra las normas de referencia. Los valores comparados son: el conjunto de valores río arriba, el segundo río abajo y el tercero es la suma de los valores río arriba y río abajo.

Límites máximos normativos	Agua potable ¹ , [Pb] en mg/L	0.0100
	Descarga de agua a alcantarillado urbano, promedio diario ² , [Pb], en mg/L	1.0000
	Ríos Protección vida acuática - promedio mensual ² , [Pb], en mg/L	0.5000
	Suelo en humedales naturales -promedio mensual ³ , [Pb], en mg/L	0.2000
Resultados obtenidos	\bar{x} , [Pb] en mg/L, río arriba (n=14)	0.0012
	\bar{x} , [Pb] en mg/L, río abajo, (n=15)	0.0092
	\bar{x} , [Pb] en mg/L, río arriba + río abajo, (n=29)	0.0054
	mediana, [Pb] en mg/L, río arriba, (n=14)	0.0008
	mediana, [Pb] en mg/L, río abajo, (n=15)	0.0022
	mediana, [Pb] en mg/L, río arriba + río abajo, (n=29)	0.0017

1. NOM-001-ECOL-1996, 2003

2. NOM-002-ECOL-1996, 2003

3. NOM-127 SSA1-1994, 2000

4.2 Plomo en sedimentos.

En la figura 4.2 se presentan las concentraciones medias obtenidas para sedimentos por punto de muestreo a través de todas las fechas donde se observó que un punto está muy por arriba de los demás en P6, fecha D. Todos los valores están entre 800 y 6000 mg/Kg. El análisis estadístico de Tukey y Kramer mostró que no hay diferencia significativa entre todos los puntos y tampoco entre el grupo de datos río arriba y río abajo (cuadro 4.6). La concentración de plomo en la naturaleza de la corteza terrestre en este lugar prevalece para aportar a los sedimentos el plomo que lo pueden estar acumulando a través del tiempo. En el cuadro 4.5. Son presentados las medias de los valores de las concentraciones de plomo en sedimentos en general todos son resultados por encima de la normatividad de referencia. Actualmente en México no hay una normatividad de plomo en sedimento, es por ello que se utilizó la NOM 147 SEMARNAT-SSA1, 2007 para suelos, la normatividad internacional nos indica que valores por encima de 400 mg/Kg para Pb suelo residencial en áreas de juego (ATSDR, 2007), se consideran contaminados y son susceptibles de remediarse, cuando la concentración se presenta en un área menor o igual a 1000 m². En el cuadro 4.7 se comparan las concentraciones de la norma de referencia contra los resultados obtenidos. Observando que solo 2 valores están por debajo de los 800 mg/Kg Pb. Los resultados obtenidos indican que hay niveles altos de plomo en el río y que casi todos superan los límites permisibles para suelo. La concentración de plomo en los sedimentos fue muy alta en el transecto muestreado del Río Escanela y puede ser susceptible a otros estudios de análisis de suelos y sedimentos, que pudieran tomar medidas preventivas al respecto.

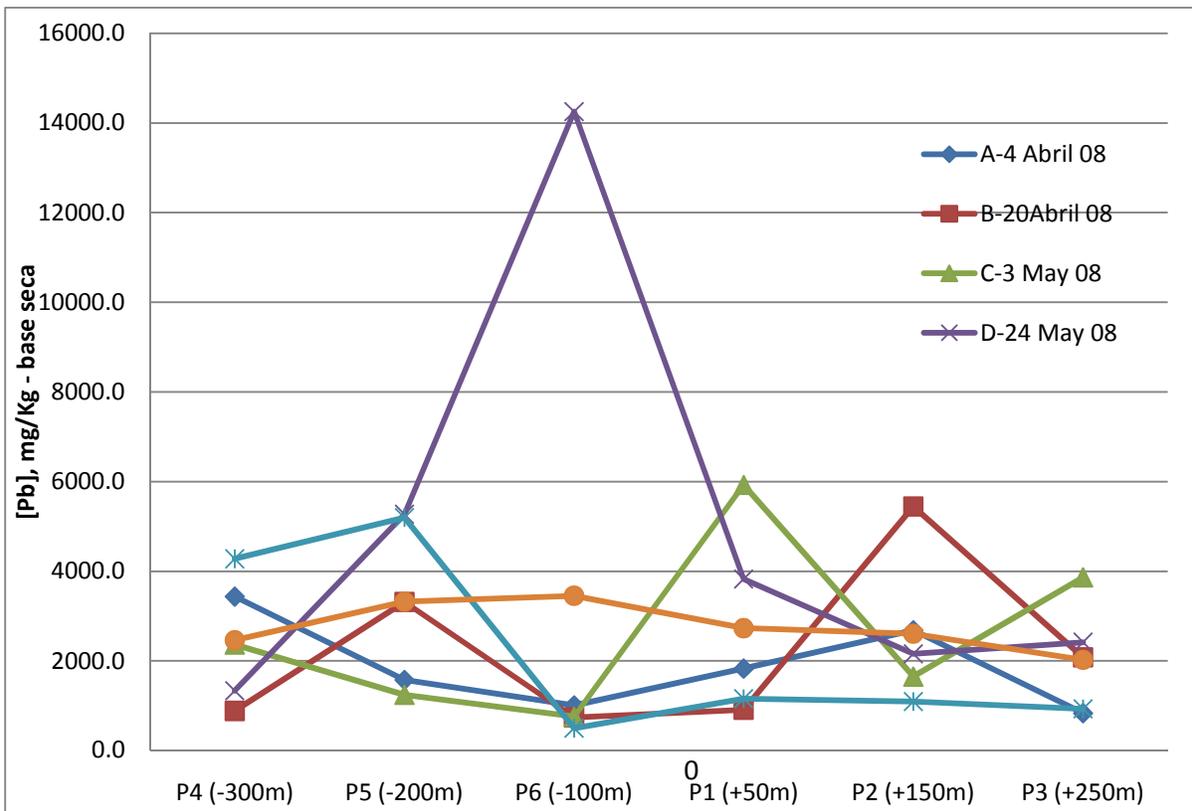


Figura 4.2 Concentración promedio de plomo en sedimentos por punto de muestreo, en el transecto del Río Escanela

Cuadro 4.5 Concentración promedio de plomo en sedimentos por ICP-MS. En todos los casos se superan las los niveles máximos permisibles para suelo de 400 suelo agrícola y 800 mg/Kg base seca suelo comercial.

Concepto	Río arriba, en mg/Kg – base seca			Rio abajo, en mg/Kg (ppm) - base seca		
	P4 (-300m)	P5 (-200m)	P6 (-100m)	P1 (+50m)	P2 (+150m)	P3 (+250m)
A - 11 abril 08	3434.7 ¹	1576.9	1012.3	1829.0	2681.7	835.7
B - 18 abril 08	885.5	3315.8	740.7	908.3	5443.2	2079.0
C - 3 mayo 08	2366.2	1244.8	757.2	5925.8	1651.4	3863.2
D - 24 mayo 08	1337.5	5270.6	14254.7²	3827.8	2158.6	2417.0
E - 24 junio 08	4278.1	5194.3	499.2²	1159.7	1092.0	930.7
\bar{x}_p , mg/Kg - base seca, (n=5)	2460.4	3320.5	3452.8	2730.1	2605.4	2025.1
$\bar{x}_{P456, P123}$, en mg/Kg -base seca, (n=15)	3078.9			2453.5		
Me ³ , P456, P123, mg/Kg-base seca, (n=15)	1576.9			2079.0		
Me, P456123, mg/kg – base seca (n=30)	1954.0					
\bar{x} , P456123, mg/Kg, base seca (n=30)	2765.7					
σ , toda la muestra n=30	2701					

1. Cada valor es individual y es el promedio de una muestra analizada por triplicado por ICP-MS. Las medias son el promedio de los 5 valores de las fechas indicadas y la mediana se toma del grupo de valores indicados de n=15 y n=30.
2. Valores en negritas indican valor más bajo y más alto, encontrado en el P6. Río arriba de la mina.
3. Me= valor de la mediana de la muestra.
4. La variación estándar es más ala que la media de datos lo que indica mucha dispersión de datos.

Cuadro 4.6. Comparación estadística de puntos de muestreo de concentración promedio de plomo en sedimentos. Tres comparaciones realizadas, la primera es con los puntos río arriba, los cuales nos indican que no hay diferencia estadística significativa entre ellos (P4, P5 y P6). De igual manera entre los puntos P1, P2 y P3, no hubo diferencia estadística significativa. El mismo resultado se encuentra al comparar entre el grupo de datos de los puntos río arriba y río abajo.

Referencia	punto	Letra que indica si hay diferencia estadística significativa ¹	\bar{x} mg/Kg (ppm) – base seca
Río arriba	P4 ² (-300m)	a	2460
	P5 (-200m)	a	3321
	P6 (-100m)	a	3453
Río Abajo	P1 (+50m)	a	2730
	P2 (+150m)	a	2605
	P3 (+250m)	a	2025
río arriba	P456 ³	a	3078
río abajo	P123 ³	a	2454

Las comparaciones fueron realizadas por el método de Tukey y Kramer con $\alpha=0.05$

1. La misma letra indica que no hay diferencia estadística significativa, letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.
2. Para cada punto n=5.
3. En los grupos de puntos río arriba (P456) y río abajo (P123), n=15.

Cuadro 4.7. Concentración promedio de plomo en sedimentos contra la normatividad para suelos NOM 147. En todos los casos superan los niveles máximos permisibles.

Límites máximos normativos ¹	Uso agrícola – límite máximo permitido, en mg/kg – base seca	400
	Uso residencial – límite máximo permitido, en mg/kg base seca	800
Resultados obtenidos	\bar{x} , en mg/Kg – base seca, río arriba (n=15)	3078
	\bar{x} , en mg/Kg – base seca, río abajo (n=15)	2454
	\bar{x} , en mg/Kg – base seca, río abajo (n=30) río arriba + río abajo	2766
	Me, mediana, en mg/kg base seca – río arriba (n=15)	1577
	Me, mediana, en mg/kg base seca – río abajo, (n=15)	2079
	Me, mediana, en mg/kg base seca – río arriba + río abajo, (n=30)	1954

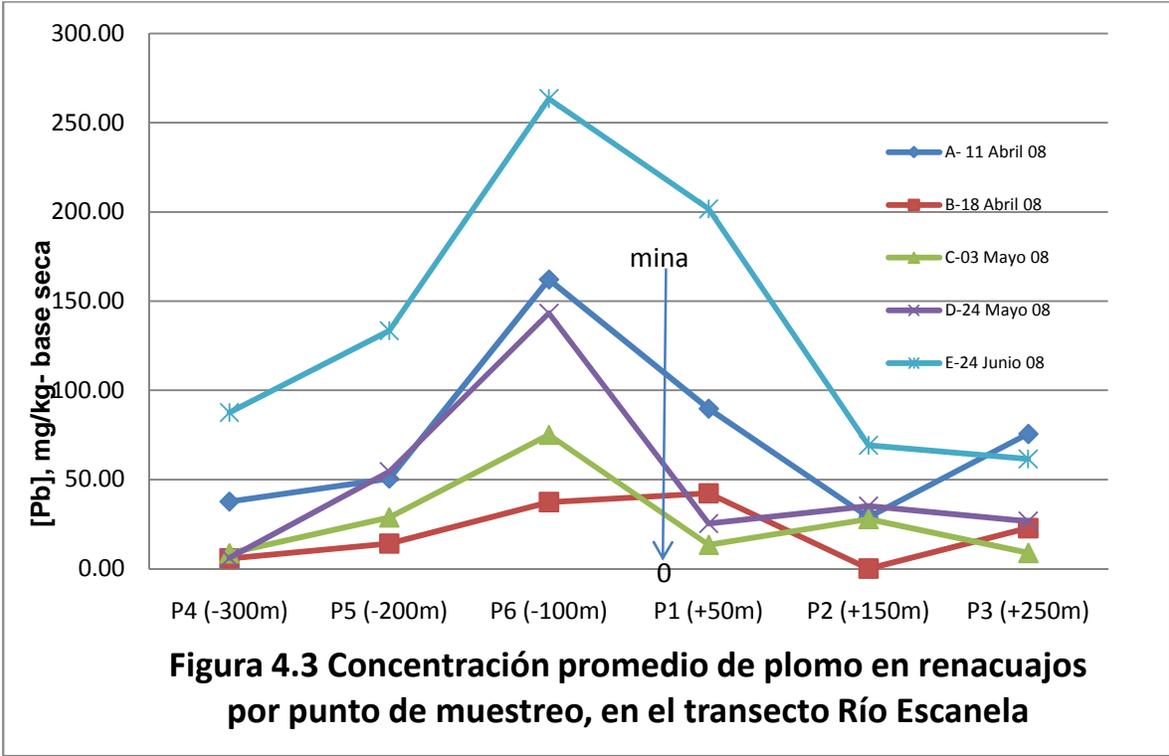
1. NOM-147 SEMARNAT-SSA1 del 2 de marzo del 2007.

4.3 Plomo en renacuajos.

En la figura 4.3 se presentan las concentraciones medias obtenidas de plomo en renacuajos por punto de muestreo a través de todas las fechas, donde se pudo mostrar que hay 2 valores en los puntos P6 (-100m) y en el P1 (+50m), en los que los valores son altos respecto a todo el grupo de valores y son el la fecha E, con la primera llegada de lluvias e incremento del volumen de agua.

El análisis estadístico (Tukey y Kramer), mostró que no hay diferencia significativa entre todos los puntos y tampoco entre el grupo de datos río arriba y río abajo como se indica en los cuadros 4.8 y 4.9.

En el cuadro 4.10 se presentan los promedios de las concentraciones de plomo en agua, sedimentos y renacuajos y se pudo observar que solo la concentración media en agua es superior en río abajo. La mediana de datos se mantiene en el mismo comportamiento. En sedimentos la media es más baja río abajo, pero la mediana de datos es más alta río arriba y finalmente en la concentración media de plomo en renacuajos los valores de la media y la mediana de datos es más baja río arriba. Estos resultados no presentan un comportamiento que nos indique alguna tendencia en río abajo o río arriba porque se contraponen para llegar a alguna conclusión. Sin embargo con la prueba estadística (Tukey y Kramer) nos indicó que en sedimentos y renacuajos no hay diferencias significativas. En agua si hay diferencia estadística significativa, lo que pudiera indicar que si hay factores que pudieran estar afectando la concentración de plomo en agua en los puntos río abajo.



Cuadro 4.8. Concentración promedio de plomo en renacuajos por ICP-MS. Los valores en negritas son los valores bajo y alto obtenidos. Los valores de las medias y medianas nos indican que la concentración de plomo en renacuajos es mayor en río arriba.

fecha	Río arriba			Río abajo		
	P4 (-300m)	P5 (-200m)	P6 (-100m)	P1 (+50m)	P2 (+150m)	P3 (+250m)
A - 11 abril 08	37.61 ¹	50.45	162.16	89.73	28.88	75.55
B - 18 abril 08	5.79	14.07	37.34	42.31	0.06²	22.74
C - 3 mayo 08	8.65	28.79	75.01	13.43	27.83	8.92
D - 24 mayo 08	6.10	54.43	143.17	25.26	35.10	26.63
E - 24 junio 08	87.54	133.40	263.48²	201.72	69.16	61.57
\bar{x}_p , mg/Kg - base seca, (n=5)	29.14	56.23	136.23	74.49	32.21	39.08
$\bar{x}_{P456, P123}$, en mg/Kg - base seca, (n=15)		73.87			48.59	
Me^3 P456, P123, mg/Kg-base seca, (n=15)		50.45			28.88	
Me , P456123, mg/kg – base seca (n=30)			37.48			
\bar{x} , P456123, mg/Kg, base seca (n=30)			61.23			
σ^4 , toda la muestra n=30			62.72			

1. Cada valor es individual y es el promedio de una muestra analizada por triplicado por ICP-MS. Las medias son el promedio de los 5 valores de las fechas indicadas y la mediana se toma del grupo de valores indicados de n=15 y n=30.
2. Valores en negritas indican valor más bajo y más alto, encontrado en el P6. Río arriba de la mina.
3. Me= valor de la mediana de la muestra.
4. La variación estándar es más alta que la media de datos.

Cuadro 4.9 Comparación estadística de puntos de muestreo de concentración promedio de plomo en renacuajos. Tres comparaciones fueron realizadas. Los puntos río arriba indicaron que no hay diferencia significativa entre ellos, el mismo resultado se obtiene en los puntos río abajo, y también en la comparación entre el grupo de puntos río arriba contra los de río abajo.

Referencia	punto	Letra que indica si hay diferencia estadística significativa ¹	\bar{x} mg/kg – base seca
	P4	a	29.14
Río arriba	P5	a	56.23
	P6	a	136.23
	P1	a	74.49
Río abajo	P2	a	32.21
	P3	a	39.08
Promedio rio arriba	P456	a	73.87
Promedio río abajo	P123	a	48.59

Las comparaciones fueron realizadas por el método de Tukey y Kramer con $\alpha=0.05$

1. La misma letra indica que no hay diferencia estadística significativa, letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

Cuadro 4.10 Concentración promedio de plomo en agua, sedimentos y renacuajos. Solo en agua, la concentración de plomo es mayor río abajo, en sedimentos y renacuajos es a la inversa, excepto por la mediana en sedimentos.

Matriz	Variable	Río arriba n=15 P456	Río abajo n=15 P123	En todos los puntos n=30 P456123
Agua [Pb], (µg/L)	\bar{x}	1.19	9.25	5.36
	Me=mediana	0.7785	2.23	1.66
En sedimentos [Pb], (mg/Kg base seca)	\bar{x}	3078.9	2453.5	2765.7
	Me =Mediana	1576.9	2079.0	1954.0
En renacuajos [Pb], (mg/Kg base seca)	\bar{x}	73.87	48.59	61.23
	Me=Mediana	50.45	28.88	37.48

4.4 Evaluación de daño genotóxico.

En la figura 4.4 se presentan algunas fotografías representativas de células de renacuajos río arriba y río abajo de la mina. En las fotografías río arriba de la mina se puede observar un menor daño genético los núcleos de las células casi no presentan rotura en las cadenas de ADN, las fotografías de río abajo presentan un mayor daño genético con una mayor longitud de cauda o cometa.

En el Cuadro 4.11 fueron definidos ocho cuadros en donde están identificados diferentes estudios de los resultados obtenidos de longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda. Estos resultados fueron determinados a través del software comet y fueron los valores más representativos del estudio. En estos cuadros no aparecen los resultados de la fecha A porque, en esta primera fecha del 11 de abril de 2008, los renacuajos murieron antes de hacer los muestreos de sangre

Los resultados de las lecturas de las laminillas se presentan en los cuadros 4.11.1 al 4.11.8. Los resultados fueron ordenados de dos maneras por puntos y por fechas, para revisar y analizar comportamientos en todo el transecto del río. También fueron realizadas comparaciones múltiples para determinar si había diferencias significativas entre los puntos río arriba, río abajo o bien combinaciones de ellas, usando el análisis estadístico de Tukey y Kramer.

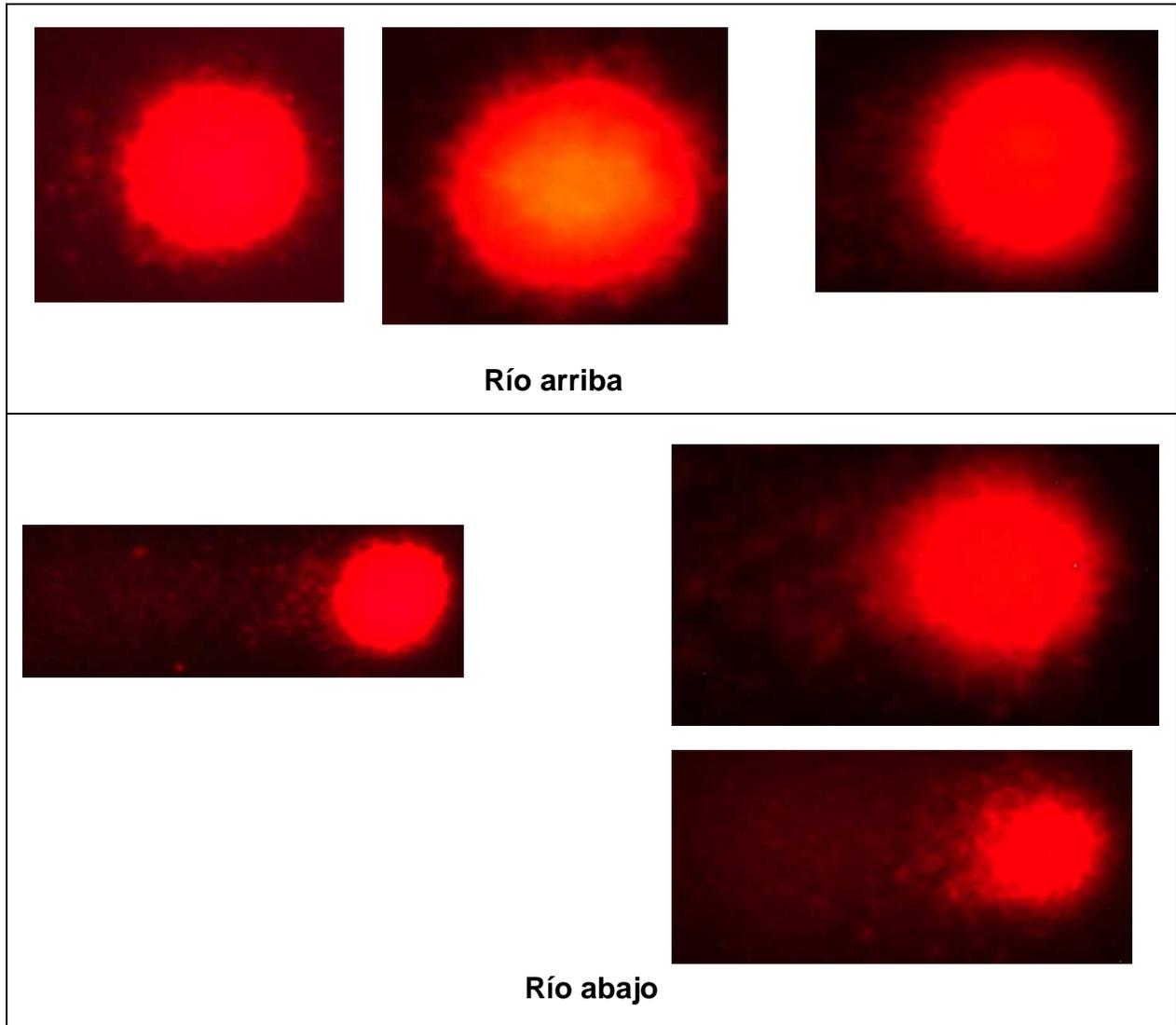


Figura 4.4 Núcleos representativos de células de renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotypanum*, en muestras obtenidas río arriba y río abajo de la mina del transecto del Río Escanela.

Cuadro 4.11 Matriz que indica las comparaciones realizadas entre fechas, puntos y grupos de muestreo.

Fechas	Cuadro 4.11.1 Daño genético en cada punto río arriba de la mina			Cuadro 4.11.2 Daño genético en cada punto río abajo		
	P4 (-300m)	P5 (-200m)	P6 (-100m)	P1 (+50m)	P2 (+150m)	P3 (+250m)
B - 18 abril 08	P4-B	P5-B	P6-B	P1-B	P2-B	P3-B
C - 3 mayo 08	P4-C	P5-C	P6-C	P1-C	P2-C	P3-C
D - 24 mayo 08	P4-D	P5-D	P6-D	P1-D	P2-D	P3-D
E - 24 junio 08	P4-E	P5-E	P6-E	P1-E	P2-E	P3-E
Fechas	Cuadro 4.11.3 Daño genético entre puntos río arriba			Cuadro 4.11.4 Daño genético entre puntos río abajo		
B - 18 abril 08	P4	P5	P6	P1	P2	P3
C - 3 mayo 08	P4	P5	P6	P1	P2	P3
D - 24 mayo 08	P4	P5	P6	P1	P2	P3
E - 24 junio 08	P4	P5	P6	P1	P2	P3
Fechas	Cuadro 4.11.5 Daño genético entre todos los puntos					
B - 18 abril 08	P4	P5	P6	P1	P2	P3
C - 3 mayo 08	P4	P5	P6	P1	P2	P3
D - 24 mayo 08	P4	P5	P6	P1	P2	P3
E - 24 junio 08	P4	P5	P6	P1	P2	P3
Fechas	Cuadro 4.11.6 Daño genético entre puntos río arriba y río abajo, acumulado					
Todas las fechas	P4BCDE	P5BCDE	P6BCDE	P1BCDE	P2BCDE	P3BCDE
Fechas	Cuadro 4.11.7 Daño genético entre todos los puntos, acumulado					
Todas las fechas	P4BCDE	P5BCDE	P6BCDE	P1BCDE	P2BCDE	P3BCDE
Fechas	Cuadro 4.11.8 Daño genético entre dos punto, acumulado					
BCDE- todas las fechas	PX = P456-BCDE			PY=P123-BCDE		

En el Cuadro 4.11.1 fueron ordenados los datos de longitud de cauda (LC), momento de Olive (MO) y momento de cauda (MC), la comparación de valores es vertical por fechas en cada punto río arriba de la mina, en el punto 4 puede observar que los parámetros LC y MO hubo diferencia significativa, no así en el momento de cauda en donde en la fecha B, no presenta diferencia significativa con las fechas C y D. Este punto es de baja profundidad (30 a 40 cm), de corrientes rápidas con obstáculos de piedras bajas, muy amplio y con pocos sedimentos. En el punto 5 se observó que las comparaciones son más complejas, en las fechas B y E no hay diferencias significativas en los parámetros de LC. En MO, las fechas B y E, no hay diferencia significativa pero esto también se cumple entre las fechas B y D y entre las fechas C y D, tampoco hay diferencia significativa. Sin embargo entre las fechas B y C si hay diferencia estadística significativa y la fecha E, hay diferencia significativa con las fechas C y D. En el mismo punto en el parámetro MC es muy similar la comparación con MO, las fechas B y E, no hay diferencia, y entre C y D tampoco hay diferencia significativa, y estas dos fechas son significativamente diferentes de B y E. El punto B es significativamente diferente de las fechas C y D. mientras que en fecha E hay diferencia estadística significativa de la fecha C. El punto 5 presenta parámetros tales como profundidad de 1 metro, en forma de poza hay mayor permanencia del agua y presenta una gran cantidad de sedimentos. En el punto 6 tenemos solo 3 fechas de comparación, B, D y E; porque los renacuajos en la fecha C (3 de mayo 08) todos murieron y no se les extrajo sangre. Entre las fechas B y D no hay diferencia estadística significativa en los tres parámetros LC, MO, y MC, pero si hay diferencia estadística significativa estas dos fechas en comparación con la fecha D. El punto también es de baja profundidad con rápidos y muy poco sedimento.

En el análisis de estos puntos indican que hay condiciones variables en el río que pueden afectar el daño genético, las cuales pueden estar a la estabilidad del punto de muestreo, relacionado al flujo y volumen de agua, así como movimiento de los sedimentos, en los puntos de mayor volumen de agua, corresponde a un mayor daño genético, en las fechas B y E.

Cuadro 4.11.1 Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum* en cada punto río arriba de la mina. Entre las fechas de muestreo fue realizada una comparación vertical de valores promedio de daño genético en cada punto en los parámetros de longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda.

Punto	fecha	n	longitud de cauda [\bar{x}]	Momento de Olive, [\bar{x}]	Momento de cauda [\bar{x}]
P4 (-300m)	B - 18 abril 08	300	1.34 ^c	0.66 ^c	0.46 ^{bc}
	C - 3 mayo 08	300	2.29 ^b	2.02 ^b	1.38 ^b
	D - 24 mayo 08	300	0.14 ^d	0.00 ^d	0.01 ^c
	E - 24 junio 08	299	3.93 ^a	3.72 ^a	2.68 ^a
P5 (-200m)	B - 18 abril 08	300	2.13 ^a	1.18 ^{ab}	0.95 ^a
	C - 3 mayo 08	300	0.42 ^b	0.10 ^c	0.03 ^c
	D - 24 mayo 08	300	0.62 ^b	0.51 ^{bc}	0.27 ^{bc}
	E - 24 junio 08	299	2.06 ^a	1.99 ^a	0.82 ^{ab}
P6 (-100m)	B - 18 abril 08	300	1.16 ^b	0.60 ^b	0.20 ^b
	C - 3 mayo 08	--	-	-	-
	D - 24 mayo 08	300	1.01 ^b	0.71 ^b	0.47 ^b
	E - 24 junio 08	300	4.26 ^a	3.96 ^a	3.16 ^a

- Tukey y Kramer, $\alpha=0.05$

- La misma letra en los valores obtenidos en el superíndice indica que no hay diferencia estadística significativa, letra diferente indica que si hay diferencia estadística significativa.

- En fecha C, punto 6 murieron los renacuajos, no se tomó muestra de sangre.

En el Cuadro 4.11.2 se presentan los resultados obtenidos en río abajo, el punto 1 solo en la fecha E, se encontró diferencia estadística significativa en los tres parámetros LC, MO y MC. En el punto 2 las fechas C y D no tienen diferencias estadísticas significativas en los tres parámetros LC, MO y MC, sin embargo estas fechas presentaron significancia estadística con las fechas B y E pero solo en LC y MO, ya que en MC solo hay diferencia estadística significativa con la fecha B. En el punto 3 las fechas B y D no hay diferencia estadística significativa en los tres parámetros LC, MO y MC, pero si hay con respecto a las fechas D y E peros solo en los parámetros de LC y MO. En momento de cauda solo la fecha E tiene diferencia estadística significativa de las fechas B, C y D, en las cuales no hay diferencia estadística significativa. El mayor daño genético fue en la fecha E, en los puntos 1 y 3, ya que se encontraron valores altos, en punto 1 los valores fueron en LC igual a 8.96 μ m, MO igual a 12.89 y en MC igual a 13.86, con respecto a los valores que les siguen los cuales fueron en la fecha B, con 1.61 μ m (LC), 1.21 (MO) y 0.55 (MC) respectivamente. En el punto 1 los valores obtenidos fueron 9.12 μ m (LC), 11.30 (MO) y 9.61 (MC), con respecto a los valores que les siguen fueron en la fecha D, 2.72 μ m (LC), 11.30 (MO) y 9.61 (MC) respectivamente.

Cuadro 4.11.2 Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum* en cada punto río abajo de la mina. Comparación de valores promedio de daño genético entre fechas de muestreo en cada punto. Verticalmente se comparan los parámetros de longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda

Punto	Fecha	n	longitud de cauda [\bar{x}]	Momento de Olive [\bar{x}]	Momento de cauda [\bar{x}]
P1 (+50m)	B - 18 abril 08	91	1.61 ^b	1.21 ^b	0.55 ^b
	C - 3 mayo 08	300	1.51 ^b	1.10 ^b	0.44 ^b
	D - 24 mayo 08	300	1.09 ^b	0.56 ^b	0.22 ^b
	E - 24 junio 08	300	8.96 ^a	12.89 ^a	13.86 ^a
P2 (+ 150m)	B - 18 abril 08	286	5.18 ^a	4.61 ^a	3.55 ^a
	C - 3 mayo 08	300	1.47 ^b	1.19 ^b	0.64 ^b
	D - 24 mayo 08	300	1.41 ^b	0.89 ^b	0.39 ^b
	E - 24 junio 08	300	0.21 ^c	0.00 ^c	0.24 ^b
P3 (+250m)	B - 18 abril 08	300	1.16 ^b	0.75 ^b	0.25 ^b
	C - 3 mayo 08	300	0.82 ^c	0.45 ^c	0.23 ^b
	D - 24 mayo 08	300	2.72 ^b	2.81 ^b	1.77 ^b
	E - 24 junio 08	300	9.12 ^a	11.30 ^a	9.61 ^a

- Tukey y Kramer, $\alpha=0.05$

- La misma letra en los valores obtenidos en el superíndice indica que no hay diferencia estadística significativa, letra diferente indica que si hay diferencia estadística significativa.

En el cuadro 4.11.3 se presentan los resultados obtenidos para los puntos río arriba, en los que fue realizado un estudio horizontal de cada parámetro por cada punto y fecha de muestreo. En las fechas B y E, la longitud de cauda (LC) en los puntos 4 y 6 no presentaron diferencia estadística significativa entre ellos pero si hay diferencia estadística significativa con respecto al punto 5. En la fechas C y D, si hay diferencia significativa entre todos los puntos. En el parámetro momento de Olive (MO), las fechas B, C y D en todos los puntos (P456), no se encontraron diferencias estadísticas significativas. En la fecha E, los puntos 4 y 6 no muestran diferencia estadística significativa, pero con respecto al punto 5, si hay diferencia estadística significativa. En momento de cauda (MC), hay mayores diferencias estadísticas significativas entre los puntos, en la fecha B el punto 4 tiene diferencia estadística significativa con el punto 6 pero no con el punto 5, o bien tiene diferencia estadística significativa con el punto 5 pero no con el 6. La fecha D, es similar el comportamiento a la fecha B pero el punto de referencia es el punto 5, este puede ser estadísticamente diferente al punto 4 o al punto 6. En la fecha E, todos los puntos 4, 5 y 6 son estadísticamente diferentes. Los puntos 4 y 6 son muy parecidos, con baja profundidad, mayor flujo de agua y con poco sedimento, en los tres parámetros LC, MO y MC, se pudo observar que hay repeticiones en donde indican que no hay diferencias estadísticas significativas entre estos puntos.

En el cuadro 4.11.4 se presentan los resultados obtenidos para los puntos río abajo, en los que fue realizado un estudio horizontal de cada parámetro por cada punto y fecha de muestreo. Para las fechas B y E, la LC, en los puntos 1 y 3 no hay diferencia significativa entre ellos, pero si hay con respecto al punto 2. En la fecha D hay diferencia estadística significativa entre los tres puntos y en la fecha C los puntos 1 y 2 no hay diferencia estadística significativa pero si hay con respecto al punto 3. En MO y MC, se repite el mismo comportamiento en las fechas B y E, los puntos 1 y 3 no muestran diferencias significativas entre ellos pero si con respecto al punto 2. Sin embargo en las fechas C y D, los puntos 1 y 2 no hay diferencias estadísticas significativas entre ellos pero si con respecto al punto 3.

Cuadro 4.11.3 Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum* entre puntos por fecha de muestreo río arriba de la mina. Horizontalmente fueron comparados los parámetros longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda.

Parámetro	fecha	P4 (-300m)	P5 (-200m)	P6 (-100m)
Longitud de cauda	B - 18 abril 08	1.34 ^b	2.13 ^a	1.15 ^b
	C - 3 mayo 08	2.29 ^a	0.41 ^b	—
	D - 24 mayo 08	0.13 ^c	0.62 ^b	1.0 ^a
	E - 24 junio 08	3.93 ^a	2.06 ^b	4.26 ^a
Momento de Olive	B - 18 abril 08	0.66 ^a	1.18 ^a	0.60 ^a
	C - 3 mayo 08	2.02 ^a	0.10 ^a	—
	D - 24 mayo 08	0.00 ^a	0.51 ^a	0.01 ^a
	E - 24 junio 08	3.72 ^a	1.99 ^b	3.95 ^a
Momento de cauda	B - 18 abril 08	0.46 ^{ab}	0.95 ^a	0.20 ^b
	C - 3 mayo 08	1.38 ^a	0.03 ^b	—
	D - 24 mayo 08	0.27 ^b	0.47 ^{ab}	0.01 ^a
	E - 24 junio 08	2.68 ^a	0.82 ^b	3.16 ^a

- Tukey y Kramer, $\alpha=0.05$

- La misma letra en los valores obtenidos en el superíndice indica que no hay diferencia estadística significativa, letra diferente indica que si hay diferencia estadística significativa.

Cuadro 4.11.4 Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum* entre puntos por fecha de muestreo río abajo de la mina. Horizontalmente fueron comparados los parámetros longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda.

Parámetro	Fecha	Punto 1 +50m	Punto 2 +150m	Punto 3 +250m
Longitud de cauda	B - 18 abril 08	1.61 ^b	5.18 ^a	1.16 ^b
	C - 3 mayo 08	1.51 ^a	1.47 ^a	0.82 ^b
	D - 24 mayo 08	1.08 ^b	0.21 ^c	2.72 ^a
	E - 24 junio 08	8.96 ^a	1.41 ^b	9.11 ^a
Momento de Olive	B - 18 abril 08	1.21 ^b	4.61 ^a	0.75 ^b
	C - 3 mayo 08	1.10 ^a	1.19 ^a	0.46 ^b
	D - 24 mayo 08	0.56 ^b	0.00 ^b	2.81 ^a
	E - 24 junio 08	12.88 ^a	0.89 ^b	11.30 ^a
Momento de Cauda	B - 18 abril 08	0.55 ^b	3.55 ^a	0.25 ^b
	C - 3 mayo 08	0.44 ^a	0.64 ^a	0.23 ^a
	D - 24 mayo 08	0.22 ^b	0.24 ^b	1.77 ^a
	E - 24 junio 08	13.88 ^a	0.39 ^b	9.61 ^a

- Tukey y Kramer, $\alpha=0.05$

- La misma letra en los valores obtenidos en el superíndice indica que no hay diferencia estadística significativa, letra diferente indica que si hay diferencia estadística significativa.

En el Cuadro 4.11.5 se realizó una comparación horizontal entre todos los puntos y fechas por cada parámetro encontrando que la longitud de cauda en la fecha B en cuatro puntos (4, 6, 1 y 3), no hay diferencia estadística significativa, y hay diferencia estadística significativa con el punto 5 y 2. Entre los puntos 5 y 1 no hay diferencia estadística significativa, pero hay diferencia estadística significativa con los puntos 4, 6, 2 y 3. En la fecha C el punto 4 y 2 no hay diferencia estadística significativa entre ellos pero si con los puntos 5, 1 y 3. Los puntos 1 y 2 no tienen diferencia estadística significativa pero si hay con respecto a los otros puntos. Los puntos 5 y 3 también muestran que no hay diferencia estadística significativa pero si con respecto a los otros puntos 4, 1 y 2. En la fecha D los puntos 5, 6 y 1 no muestran diferencia estadística significativa pero si hay con el resto de los puntos, los puntos 4, 5 y 2 también muestran que no hay diferencias estadísticas significativas entre ellos y la última tercia que no muestra diferencia estadística significativa entre ellos son los puntos 4, 5 y 6. En la fecha E se forman parejas de valores que no muestran diferencias significativa entre ellos (puntos 4 y 6, puntos 1 y 3, y 5 y 2), pero si hay diferencias con los otros puntos con respecto a los otros puntos.

En momento de Olive en la fecha B los puntos 4, 5, 6, 1 y 3 no muestran diferencia estadística significativa. En la fecha C los puntos 1, 2 y 3 no muestran diferencias estadísticas significativas, también la pareja de los puntos 5 y 3 no muestran diferencia estadística significativa. En la fecha D los puntos 4, 5, 6, 1 y 2 no muestran diferencia estadística significativa. Por último en la fecha E, los puntos 4, 5 y 6 no muestran diferencia estadística significativa, otros pares de valores que no muestran diferencia estadística significativa son los puntos 5 y 2, y los puntos 1 y 3. En cada caso mencionado no hay diferencias estadísticas con respecto a los otros puntos.

En el momento de cauda, los grupos de puntos que no muestran diferencia estadística significativa son: en la fecha B los puntos 4, 5, 6, 1 y 3. En la fecha C son los puntos 5, 1, 2 y 3. También los puntos 4 y 2. En la fecha D los puntos 4, 5, 6, 1, 2. En la fecha los puntos 4, 5, 6 y 2. En cada caso con respecto a los otros puntos si hay diferencia estadística significativa. En los parámetros de momento de Olive y momento

de cauda se obtuvieron valores de comparación más uniformes que en longitud de cauda para identificar diferencias estadísticas significativas entre los puntos. En momento de cauda de 23 valores, 5 mostraron diferencia estadística significativa.

En el Cuadro 4.11.6 se realizó una comparación independiente, puntos río arriba y puntos río abajo, integrando para cada punto todas las fechas de muestreo como uno solo, en donde se observó para longitud de cauda que en los puntos río arriba los puntos 4 y 6 no presentan diferencias estadísticas significativas, pero son significativamente diferentes con respecto al punto 5; el comportamiento fue el mismo para MO, MC. Para los puntos río abajo en los tres parámetros todos los puntos son significativamente diferentes. El punto 1 es el que presentó un mayor daño genotóxico, en segundo lugar el punto 3, y el punto 2 en tercer lugar.

Haciendo una comparación entre todos, de forma horizontal (Cuadro 4.11.7), se observó que los puntos 4, 6 y 2 no son significativamente diferentes, pero son significativamente diferentes contra los puntos 5, 1 y 3. En los parámetros de MO y MC, los puntos 4, 5, 6 y 2 no hay diferencia estadística significativa, pero son diferentes respecto a los puntos 1 y 3. El punto 1 es el que presentó y el punto 5 el de menor mayor daño genotóxico en los tres parámetros de LC, MO y MC.

Finalmente en el Cuadro 4.11.8 fueron comparados los puntos río arriba (PX-456), contra los puntos río abajo (PY-123) y el resultado fue determinante en los tres parámetros, los puntos río arriba, son significativamente diferentes a los puntos río abajo; y en los tres casos el daño genotóxico es mayor en los puntos río abajo. Considerando estos resultados podemos decir que los puntos de muestreo río abajo de la mina están siendo más vulnerables a la contaminación por las actividades del hombre incluyendo la actividad minera.

Cuadro 4.11.5 Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum* entre todos los puntos por fecha de muestreo. Horizontalmente fueron comparados los parámetros de longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda por fecha de muestreo a través de todos los puntos.

Parámetro	Fecha	Río arriba			Rio abajo		
		P4 -300m	P5 -200m	P6 -100m	P1 +50m	P2 +150m	P3 +250m
Longitud de cauda	B - 18 abril 08	1.34 ^c	2.13 ^b	1.16 ^c	1.61 ^{bc}	5.18 ^a	1.16 ^c
	C - 3 mayo 08	2.29 ^a	0.41 ^c	—	1.51 ^b	1.47 ^{ab}	0.82 ^c
	D - 24 mayo 08	0.13 ^c	0.62 ^{bc}	1.01 ^b	1.09 ^b	0.21 ^c	2.72 ^a
	E - 24 junio 08	3.93 ^b	2.06 ^c	4.26 ^b	8.96 ^a	1.41 ^c	9.12 ^a
Momento de Olive	B - 18 abril 08	0.66 ^b	1.18 ^b	0.60 ^b	1.21 ^b	4.61 ^a	0.75 ^b
	C - 3 mayo 08	2.02 ^a	0.10 ^c	—	1.10 ^b	1.19 ^b	0.46 ^{bc}
	D - 24 mayo 08	0.00 ^b	0.51 ^b	0.71 ^b	0.56 ^b	0.00 ^b	2.81 ^a
	E - 24 junio 08	3.72 ^{bc}	1.99 ^{bc}	3.95 ^b	12.89 ^a	0.89 ^c	11.30 ^a
Momento de cauda	B - 18 abril 08	0.46 ^b	0.95 ^b	0.20 ^b	0.55 ^b	3.55 ^a	0.25 ^b
	C - 3 mayo 08	1.38 ^a	0.03 ^b	—	0.44 ^b	0.64 ^{ab}	0.23 ^b
	D - 24 mayo 08	0.01 ^b	0.27 ^b	0.47 ^b	0.22 ^b	0.24 ^b	1.77 ^a
	E - 24 junio 08	2.68 ^c	0.82 ^c	3.16 ^c	13.86 ^a	0.39 ^c	9.61 ^b

- Tukey y Kramer, $\alpha=0.05$

- La misma letra en los valores obtenidos en el superíndice indica que no hay diferencia estadística significativa, letra diferente indica que si hay diferencia estadística significativa.

Cuadro 4.11.6 Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum* entre los puntos río arriba y río abajo de la mina en los parámetros de longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda.

Parámetro	río arriba		
	P4 -300m n=1199	P5 -200m n=1199	P6 -100m n=900
Longitud de Cauda	1.92 ^a	1.31 ^b	2.14 ^a
Momento de Olive	1.55 ^a	0.95 ^b	1.76 ^a
Momento de Cauda	1.13 ^a	0.52 ^b	1.28 ^a

Parámetro	río abajo		
	Punto 1 +50m n=991	Punto 2 +150m n=1186	Punto 3 +250m n=1200
Longitud de Cauda	5.41 ^a	2.26 ^c	3.45 ^b
Momento de Olive	7.26 ^a	1.85 ^c	3.83 ^b
Momento de Cauda	7.45 ^a	1.25 ^c	2.97 ^b

- Tukey y Kramer, $\alpha=0.05$
- La misma letra en los valores obtenidos en el superíndice indica que no hay diferencia estadística significativa, letra diferente indica que si hay diferencia estadística significativa.

Cuadro 4.11.7 Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum* entre todos los puntos del transecto del Río Escanela. Verticalmente son comparados los parámetros longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda.

Punto	n datos	Longitud de Cauda			Momento de Olive			Momento de cauda		
		media	desviación estándar	± error estándar	media	desviación estándar	± error estándar	media	desviación estándar	± error estándar
P4 (-300m)	1199	1.92 ^c	3.71	0.107	1.53 ^c	5.45	0.157	1.13 ^c	5.52	0.159
P5 (-200m)	1199	1.31 ^d	2.32	0.067	0.95 ^c	4.02	0.116	0.52 ^c	2.89	0.083
P6 (-100m)	900	2.14 ^c	3.69	0.123	1.75 ^c	4.99	0.166	1.27 ^c	6.12	0.204
P1 (+50m)	991	5.41 ^a	8.97	0.284	7.26 ^a	20.65	0.654	7.44 ^a	29.72	0.942
P2 (+150m)	1186	2.26 ^c	3.86	0.112	1.85 ^c	4.24	0.123	1.25 ^c	4.62	0.134
P3 (+250)	1200	3.45 ^b	6.11	0.176	3.83 ^b	9.92	0.287	2.96 ^b	11.28	0.323

- Tukey y Kramer, $\alpha=0.05$

- La misma letra en los valores obtenidos en el superíndice indica que no hay diferencia estadística significativa, letra diferente indica que si hay diferencia estadística significativa.

Cuadro 4.11.8 Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum* entre dos puntos río arriba contra río abajo de la mina. Horizontalmente son comparados cada parámetro de longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda; en los tres casos presentaron diferencias estadísticas significativas.

Característica	Río arriba	Río abajo
	$P_X(P_{456})$ (Punto 4 - n=1199) (Punto 5 - n=1199) (Punto 6 - n=900)	$P_Y(P_{123})$ (Punto 1 -n= 991) (Punto 2 - n=1186) (Punto 3 - n=1200)
	$n_{total} = 3298$	$n_{total} = 3377$
Longitud de Cauda	1.76 ^b	3.40 ^a
Momento de Olive	1.38 ^b	3.43 ^a
Momento de Cauda	0.95 ^b	3.15 ^a

- Tukey y Kramer, $\alpha=0.05$
- La misma letra en los valores obtenidos en el superíndice indica que no hay diferencia estadística significativa, letra diferente indica que si hay diferencia estadística significativa.

En la figura 4.5 se ilustran gráficamente los valores de daño genético en longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda a través del transecto muestra del Río Escanela, en el que se pudo observar la relación existente entre todos los puntos de muestreo, identificando nuevamente el punto 1 (+50m), como el de mayor daño genotóxico en los tres parámetros.

En la figura 4.6 se incluyó los resultados obtenidos de la concentración del plomo en agua, sedimentos y renacuajos, (cuadros 4.3, 4.5 y 4.8 respectivamente), los resultados del agua son los que marcan la diferencia en los puntos río abajo de la mina con la mayor concentración, en los puntos 3, 2 y 1 respectivamente. La concentración media de plomo en renacuajos y sedimentos es dividida entre 1000, para hacer una comparación relativa y gráfica con la concentración de plomo en agua, la cual presenta mayores diferencias que la concentración de plomo en renacuajos o sedimentos. El punto 1, es el que presenta el mayor daño genotóxico y en segundo lugar el punto 3, no hay una relación directa entre el daño genotóxico contra la concentración de plomo en agua, sin embargo podemos decir que hay una tendencia en río abajo de la mina, en la que se encuentra mayor daño genotóxico y mayor concentración de plomo.

Cuadro 4.12. Comparación de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum* contra concentraciones de plomo en Renacuajos, sedimentos y agua. Letras en negritas en Punto P1 y punto P3 indican el primer y segundo lugar en daño genético en las características de Longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda. Concentración en Plomo valores subrayados, el P3, P2, y P1, indican primero segundo y tercero.

Parámetro	P4 (-300m)	P5 (-200m)	P6 (-100m)	P1 (+50m)	P2 (+150m)	P3 (+250m)
Longitud de cauda, μm	1.92	1.31	2.14	5.41	2.26	3.45
Momento de Olive	1.53	0.94	1.75	7.26	1.85	3.83
Momento de Cauda	1.13	0.52	1.27	7.44	1.25	2.97
\bar{x} [Pb] en Renacuajos, ppm	29	56	136	74	32	39
\bar{x} [Pb] en sedimentos, ppm	2460	3321	3453	2730	2605	2025
\bar{x} [Pb] en agua, $\mu\text{g/L}$	0.72	1.2	1.57	<u>4.52</u>	<u>11.19</u>	<u>12.04</u>

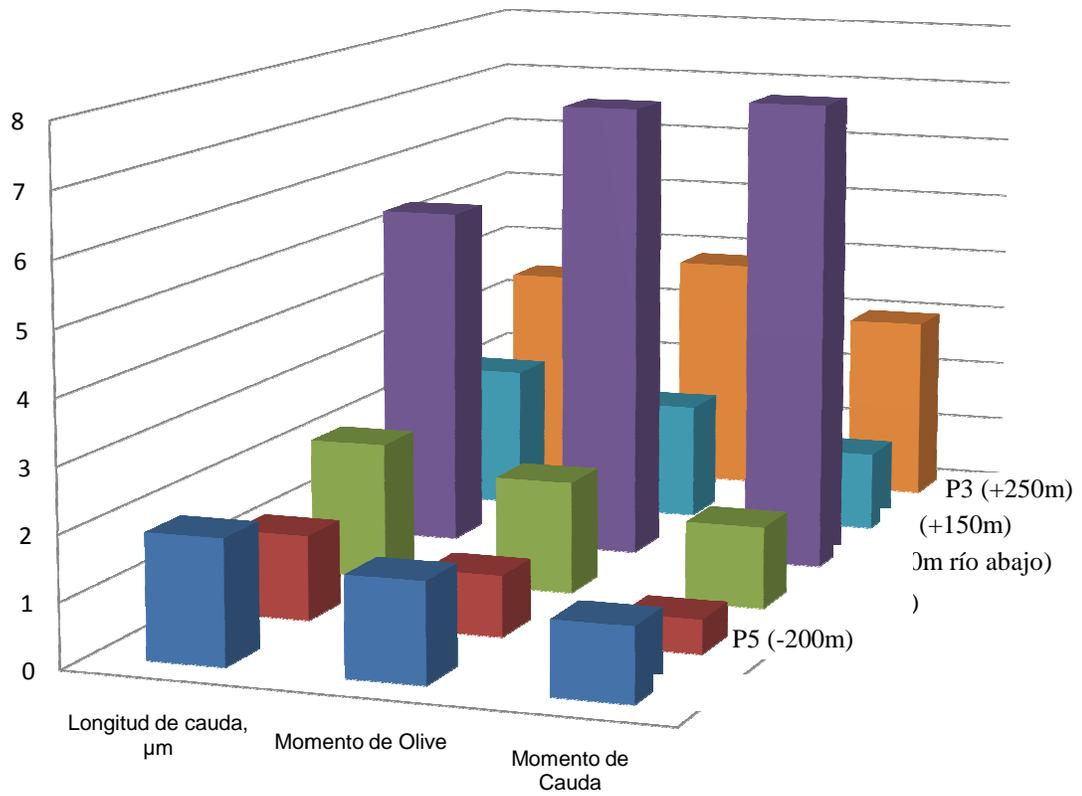


Figura 4.5 Distribución de la detección del daño genético en eritrocitos de renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum* en los parámetros de longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda en el Transecto del Río Escanela.

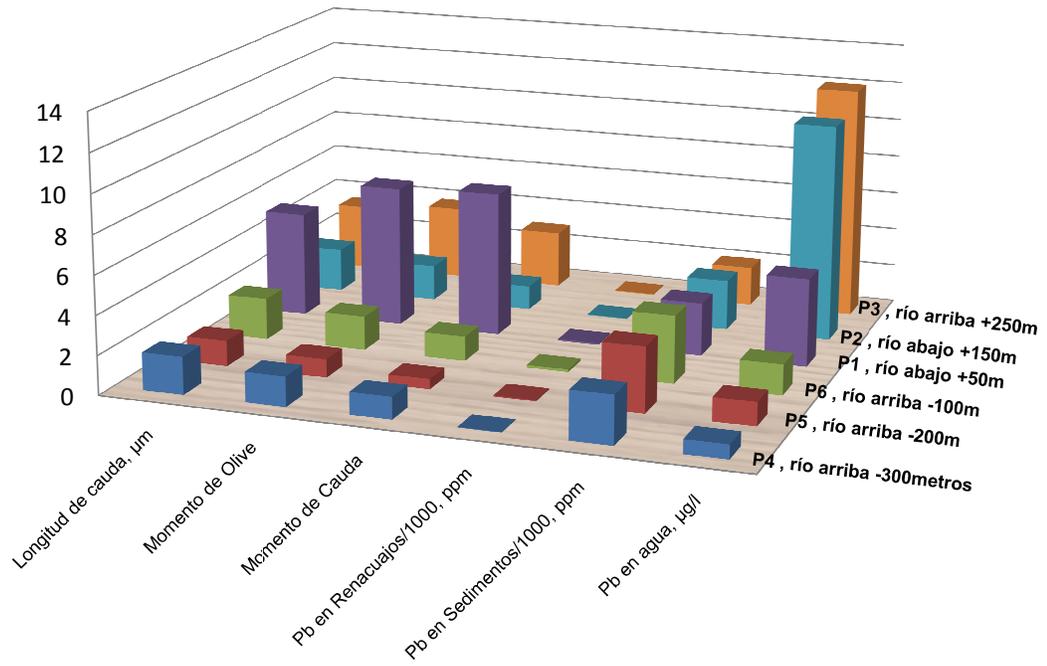


Figura 4.6 Comparación de daño genético en renacuajos *Ecnomiohyla miotympanum* contra la concentración de plomo en renacuajos, sedimentos y agua en el transecto del Río Escanela.

V. DISCUSIÓN

Las concentraciones de plomo en agua encontradas en 30 muestras de agua en los seis puntos de muestreo, cinco superaron el límite máximo permisible de concentración de plomo, para agua potable (0.01mg/L NOM-127 SSA1:1994 - 2000). La concentración promedio El promedio de resultados obtenidos río arriba fue de 0.0012 mg/L, contra 0.00925 mg/L en río abajo; lo cual nos indica que en promedio hay una mayor concentración de plomo río abajo de la mina. Para la NOM 001-ECOL: 1996 – 2003 la cual es referida a ríos y su protección de vida acuática el límite máximo permisible de concentración de plomo es un promedio mensual de 0.5 mg/L, el valor promedio de 29 muestras en un muestreo de 3 meses fue igual a 0.0054 mg/L. Lo cual indica que el Río Escanela, en el transecto de muestreo no supera el nivel de plomo permitido, para la protección de vida acuática. La inhibición bioquímica de las sustancias orgánicas empieza cuando los niveles de plomo están por encima de 0.1 mg/L y en ninguno de los casos llega a estos valores dado que el más alto esta en 0.038 mg/L, la fauna disminuye cuando supera los niveles de 0.2 mg/L, y un nivel el umbral tóxico en truchas y peces blancos cuando alcanza niveles de 0.3 mg/L (DVGW, 1985), estudios en laboratorio, para embriones de *rana bufonarum*, indican retraso en el desarrollo cuando, se encuentran concentraciones de plomo entre los 10 y 20 mg/L, y a 30 mg/L, se presenta retraso en el desarrollo de embriones y curvatura en espina dorsal (Sandoval y col, 2004); por lo tanto podemos decir que, de acuerdo a los resultados obtenidos el Río Escanela se encuentra en niveles bajos de concentración de plomo en agua, y que no presenta un riesgo para la fauna y la vida acuática.

La concentración promedio de plomo en sedimentos en todos los puntos muestreados se encuentran por encima del límite máximo permisible para el uso de suelo agrícola ó residencial (400mg/kg y 800 mg/Kg - base seca respectivamente) NOM-147 SEMARNAT-SSA1-2007). Todos los valores encontrados son por arriba de los 2000 mg/kg base seca. Los altos índices de plomo en los sedimentos nos pudieran indicar, que este lugar tiene de forma natural altos índices de plomo en la superficie terrestre. No se tiene disponible una referencia para sedimentos en la normatividad mexicana o americana hasta el momento, sin embargo países desarrollados entre ellos los Estados Unidos de América y Canadá, han considerado la recuperación o remediación de suelos de sitios contaminados cuando superan los 400mg/Kg base seca (áreas de juego) y de 1200 mg/kg (áreas de no juego) de concentración de plomo (ATSDR, 2007).

El Río Escanela sería un candidato adecuado para realizar un estudio completo para la determinación de la concentración de plomo en suelo, para determinar los niveles de concentración de plomo en el área y proponer medidas preventivas para la comunidad de alrededor de 100 familias que habitan el lugar.

En los diferentes puntos de muestreo, se encontraron concentraciones de plomo en renacuajo desde 0.063 mg/Kg base seca hasta 263.5 mg/Kg base seca, las concentraciones promedio de los puntos río arriba es 73.87 mg/kg base seca contra el promedio de los puntos río abajo 48.59 mg/Kg base seca, encontrando el promedio más alto en el punto 6 con un valor de 136.23 mg/Kg, después el punto P1 con un valor de y seguido del punto P5. Al parecer los resultados no estuvieron muy relacionados a las condiciones del lugar o agua, porque el punto P6, el más alto, es un punto de baja profundidad con poco sedimento, en contraposición de los puntos P5 y P1, en los que si había mucho sedimento y es más estable y por lo que se esperaría tener una mayor concentración el sedimento y en renacuajos, sin embargo no se presentó este comportamiento. El plomo entra a los anfibios, por la boca a través del alimento, y en su

etapa de renacuajos su principal alimento son los sedimentos, y por otro lado está la permeabilidad de su piel con el agua, que también incrementa el ingreso de plomo a su organismo, estudios relacionados en laboratorio con la especie *Sphenocephala* (Sparling y col, 2006), mencionan que renacuajos que son expuestos a concentraciones del orden de 3940 mg/kg de plomo ó mayores , muere el 100% de los individuos y que en concentraciones mayores a 2360 mg/Kg, el 100% presenta alguna especie de anormalidad en su metamorfosis, tales como problemas severos en espina dorsal, disminución en extremidades como fémur y húmero o bien deformación en los dedos y otras malformaciones en huesos. En este estudio se encontraron concentraciones de plomo en sedimentos con valores superiores a estas concentraciones de referencia (2460 en P4, 3321 en P5, 3453 en P6, 2730 en P1, 2605 en P2, y 2025 en P6, todos ellos en mg/kg base seca); en campo no se pudo observar grupos de individuos muertos en ningún punto de muestreo; o bien ranas en su etapa joven de transición en la metamorfosis con alguna anormalidad en su cuerpo.

El análisis estadístico realizado mostró que, para plomo en agua, no hay diferencias significativas entre todos los puntos, pero si se forman dos grupos, río arriba contra río abajo, río abajo si tiene diferencia estadística significativa con río arriba. En igual forma fue relacionado para plomo en sedimentos, y fue detectado que entre todos los puntos así como entre los grupos río arriba contra río abajo no hay diferencias estadísticas significativas. En la misma situación detectamos el comportamiento al determinar plomo en renacuajos; en todos los puntos no hay diferencias significativas. Tampoco hay diferencias significativas entre los grupos río abajo y río arriba de la mina.

Los resultados obtenidos en agua, sedimentos y renacuajos nos mostró que no hay diferencias estadísticas significativas entre todos los puntos de muestreo en el transecto del Río Escanela seleccionado, sin embargo solo el agua presentó diferencias río arriba con río abajo, esto nos puede indicar que hay alguna condición ambiental o antropogénica que está modificando la concentración del agua río abajo de la mina.

En nuestro estudio se emplearon eritrocitos de sangre periférica de renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum*, para evaluar el daño genotóxico, los parámetros seleccionados más representativos fueron longitud de cauda (LC), momento de Olive (MO) y momento de cauda (MC) y los resultados promedio mostraron que el punto 1 (+50 m) río abajo de la mina es el que presentó el mayor daño genotóxico en todos los parámetros de LC, MO, y MC (5.41 μ m, 7.26 y 7.44). Después fue el punto 3 río abajo de la mina (+250m) también en los tres parámetros LC, MO, y MC (3.45 μ m, 3.83 y 2.97). Los puntos 4 (-300m), punto 6 (-200m) y el punto 2 (+150m) son muy similares y el de menor daño genotóxico fue el punto 5(-200m) en LC, MO y MC (1.31 μ m, 0.94 y 0.52 respectivamente).

La concentración de plomo en agua nos indicó que en los puntos río abajo son los de mayor concentración, el punto 3 (+250m) con 12.04 μ g/L después el punto 2 (150m) con 11.18 μ g/L, y por último el punto 1 (+50m) con 4.52 μ g/L. los puntos río abajo no mostraron grandes diferencias entre ellos. La concentración de plomo en renacuajos y en sedimentos no hubo grandes diferencias entre los puntos. No hubo una relación directa entre el daño genotóxico y las concentraciones de plomo en agua, sedimentos y renacuajos, aunque la concentración de plomo en agua pudiera estar influyendo en los puntos 1 y 3, los cuales fueron los de mayor daño genotóxico.

Estudios realizados de genotoxicidad en el sur de Ontario Canadá en eritrocitos de renacuajos de las especies *Rana clamitans* y *Rana pipens*, demostraron que existe mayor daño genotóxico a DNA en sitios dedicados a la agricultura donde el uso de pesticidas es común, en comparación con otros sitios en donde no hay actividades de cultivo como en la Península de Bruce cerca de French River en Canadá. La muestra del sur de Ontario involucró 18 sitios de arroyos, estanques y drenajes de diques dedicados a la agricultura de los cuales se obtuvieron 56 muestras de un total de 606 renacuajos a los que se les realizó la electroforesis unicelular alcalina resultando con una formación de cometa. Estudios realizados en las afueras de la ciudad industrial de Windsor Ontario también mostraron un daño genotóxico alto respecto a los sitios

dedicados a la agricultura como en el sur de Ontario y en French River. El daño genotóxico a DNA varía de acuerdo a la temporada del año, de las lluvias y de los flujos de agua (Ralph y Petras, 1997). Otros estudios en laboratorio demostraron daño genotóxico en ensayo cometa, al aplicar dosis controladas de 5 herbicidas diferentes utilizados comúnmente en el control de plagas en sitios dedicados a la agricultura en eritrocitos de renacuajos de la especie *Rana catesbeiana* (rana toro) en el sur de Ontario Canadá (Clements y col., 1997), en este estudio los renacuajos fueron expuestos por un periodo de 24 horas con varias concentraciones de los herbicidas y mostraron daño significativo a DNA, con respecto a renacuajos de control que no fueron expuestos a estos herbicidas. Estudios realizados en laboratorio con diferentes dosis de plomo ($PbNO_3$), en la especie *Rana nigromaculata*, indican que el plomo es un tóxico para la reproducción en el macho por la inducción de estrés oxidativo y daño a DNA en testículos por vía de absorción de la epidermis. La reproducción de esta especie puede ser afectada por contaminantes ambientales y puede estar contribuyendo a la declinación global de anfibios (Wang y Jia, 2008). En este estudio fueron seleccionados 60 ranas adultas macho (36 a 42g), de los cuales se hicieron 6 grupos uno de ellos de control, a los otros 5 grupos les fue tratado con cinco diferentes concentraciones (0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6mg/L de $PbNO_3$), 30 días después de tratamiento fueron sacrificados y obtenido tejido testicular, indicando que los individuos de control tienen daño genético, pero en el incremento de dosis de nitrato de plomo el daño genotóxico en longitud de cauda y momento de cauda aumenta considerablemente. En la dosis de 0.4mg/L se duplica el valor de daño genotóxico en los dos parámetros LC, y MC (1.44 μ m el control y 2.99 μ m el estudio en longitud de cauda y de 0.53 el control contra 1.09 el de estudio en momento de cauda). Las ranas fueron recolectadas en las montañas de Tian-Mu Mountain en Hangzhou China, un sitio no contaminado en donde las concentraciones de plomo fueron de 6.50 μ g/L en el agua y 20.30 μ g/L en el sedimento. En comparación con nuestro estudio en renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum* (el Río Escanela, lugar montañoso en Pinal de amoles) se encontró una concentración de agua de 1.19 μ g/L río arriba y 9.25 μ g/L río abajo, en sedimentos 3078 mg/Kg base seca en río arriba y 2454 mg/Kg base seca en río abajo. En longitud de cauda se obtuvo en río

arriba 1.76 μ m y 3.40 μ m río abajo (mayor que la referencia con la adición de 0.4 mg/L de PbNO₃) en río abajo. En momento de cauda 0.95 río arriba y 3.15 en río abajo (casi 3 veces el valor de referencia con la adición de 0.4 mg/L de PbNO₃). El daño genotóxico como algo normal en los renacuajos de control en el estudio de referencia (Wang y Jia, 2008), en los que no hay una aparente influencia antropogénica y no hay ninguna interferencia de contaminación en el sitio. En nuestro estudio río arriba de la mina las actividades antropogénicas son pocas y sin embargo los valores obtenidos son similares en LC 1.44 μ m contra 1.76 μ m, y en MC 0.53 contra 0.95. En contraste en río debajo de la mina las actividades antropogénicas se incrementan fuertemente incluyendo la minera encontrando valores equivalentes a un daño provocado al adicionar en laboratorio la dosis de 0.4 μ g/L; lo que puede interpretarse que las actividades antropogénicas incluyendo la minera pueden estar provocando un daño genotóxico en renacuajos de la especie *Ecnomiohyla myotimpanum* en los puntos río abajo de la mina en el transecto seleccionado en el Río Escanela de Pinal de Amoles Querétaro.

VI. CONCLUSIONES

1. La técnica de electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa) es una técnica adecuada para ser utilizada en la evaluación del daño genotóxico en la especie *Ecnomiohyla miotympanum*.
2. Los parámetros longitud de cauda, momento de Olive y momento de cauda pueden ser utilizados para detectar daño genotóxico en renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum*.
3. Los renacuajos nativos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum* pueden ser utilizados para verificar la genotoxicidad ambiental.
4. Las actividades antropogénicas incluyendo las mineras pueden estar causando daño genético en los renacuajos nativos *Ecnomiohyla miotympanum*.
5. Las concentraciones de plomo encontradas en sedimentos y agua río abajo de la mina pueden estar causando daño genotóxico a los renacuajos de la especie *Ecnomiohyla miotympanum*.
6. Es conveniente realizar una gestión integral adecuada del lugar para determinar acciones preventivas para disminuir el impacto ambiental de la mina del lugar.

LITERATURA CITADA

- Abrebaya X. 2008. Artículo original IntraMed del 20 de Agosto de 2008. Qué es la genotoxicidad. <http://www.intramed.net/conetindover.asp>. Contenido ID=471111.
- AECO-AT. 2001. Minería de cielo abierto y sus impactos ambientales. Preparado para el frente Nacional de Oposición a la minería de Oro a Cielo Abierto. Ed. AECO-AT, Costa Rica, 10 p.
- ATSDR (2007). Agency for Toxic Substances and Disease Registry Contamination for heavy metals and lead compound.
- Ballengee B. 2009. Photo deformed, toads, each a product of selective predation. Legless frogs mystery solved-Internationale reptile conservation foundation.
- Brandon Ballengee and Stanley K. Sessions. 2009. University Of Plymouth, Plymouth, United Kingdom, Department Of Biology, Hartwick College, Oneonta, New York, Journal of experimental zoology (mol dev evol) 312b (2009) explanation for missing limbs in deformed Amphibians.
- Cardamone, M.A., J.R. Taylor, y W.J. Mitsch. 1984. Wetlands and Coal Surface Minin, 7_A Management Handbook. Kentucky: University of Louisville, Systems Science Institute. Impactos ambientales de la minería.
- Clements C, Ralph S and Petras M. 1997. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environmental & Molecular Mutagenesis* 29: 277-288 (1997).
- Córdoba P.D. y Hernández H.S. 2006. Quinta edición. Libro Toxicología. Unidad III Metales y Metaloides. 2006. Capítulo 41 Plomo. Páginas 337-345.
- Cortés-Eslava.1993. Evaluación del daño mutagénico provocado por los insecticidas organofluorados foxim y metil azinfos en *Salmonella typhimurium*. Tesis maestría Facultad de Ciencias UNAM 70p.
- DVGW. 1996. German Technical and Scientific Association for Gas and Water. Guía de protección ambiental tomo III. Catalogo de estándares ambientales (GTZ/BMZ). Capítulo 5 Sustancias y grupos de sustancias químicas. 5.4. Fichero de sustancias. 5.4.4 Páginas informativas sobres sustancias y grupos de sustancias químicas. Plomo y sus compuestos inorgánicos.

- DVGW. 1985. German Technical and Scientific Association for Gas and Water. Plomo. Toxicidad. Comportamiento en el medio ambiente. Agua. <http://ces.iisc.ernet.in/energy/HC270799/HDL/ENV/envsp/Vol341.htm>
- Domenéch X. y Parra J. 2006. Química ambiental de sistemas terrestres. Capítulo 4. Comportamiento y destino de los contaminantes en los sistemas terrestres paginas 136-138 el Plomo.
- Enciclopedia de los Municipios de México, Querétaro. 2005. Municipio de Pinal de Amoles, Reseña histórica, archivo histórico de Querétaro.www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/queretaro/.
- EPA (2001). Environmental Protection Agency 40 CFR parte 745, 2001. Lead: identification of dangerous levels of lead. Final rule.
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill K.L. 1995. The Comet Assay: A comprehensive review. *Mutat. Res.* 1995; 339: 37-59.
- Hogan D. y M. (2004). Revista de National Geographic."Ranas Rarísimas". Ejemplar marzo-abril 2004. p.10. <http://magma.nationalgeographic.com/ngexplorer/0403/articles/index.html>
- INEGI. 2004. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, estadística de la industria minero metalúrgica, en México. Minería. México en la producción mundial de minerales metálicos, **2004**. <http://cuentame.inegi.org.mx/impresion/economia/mineria.asp>
- INEGI. 2005. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, estadística de la industria minero metalúrgica, en México. Anuario Estadístico de Querétaro Arteaga, edición 2005. <http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/aee05/info/qro/mapas.pdf>
- IUCN.2009.International Union for conservation of nature, in 2004 the *Ecnomiohylla miotypanum*, red list of threatened species.
- Jiménez M.II y Jiménez M.G. 2003. El zoológico electrónico y zoo. 1999-2003. www.damisela.com/zoo/anfi/anura/index.htm
- Miyamae, Y., Yamamoto, M., Sasaki, Y.F., Kobayashi, H., Igarashi-Sogal, M., Shimoi, K. and Hayashi, M. 1998. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mut. Res.* 418: 131-140.
- NOM-001- ECOL-1996. 2003. Esta que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las aguas de descarga de aguas residuales y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación.

- NOM-002- ECOL-1996. 2003. Norma que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. Diario Oficial de la Federación.
- NOM 127 SSA1-1994. 2000. Norma para la Salud ambiental, agua para uso y consumo humano, límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación.
- NOM-147 SEMARNAT-SSA1:1994. 2007. Norma que establece los criterios para determinar concentraciones de remediación de suelos contaminados con arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, plomo, níquel, plata, selenio, talio y vanadio. Diario oficial de la Federación
- Olive PI, Banáth JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols* 2006; 1(1), 23-9.
- Olive PL, Danuta Wlodeck, And Judit Banáth (1991). DNA double strand breaks measured en individual cells subjected to gel electroforesis.
- Ralph S. and Petras M. (1997) Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single cell gel (comet) assay. *Environmental & Molecular Mutagenesis* 29: 418-430.
- Ralph Steven and Petras Michael (1998). Caged amphibian tadpoles and in situ genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay.
- Ralph S, Petras M, Raj P and Vrzoc M, (1996). Alkaline single gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. *Environmental and molecular mutagenesis* 28-112-120 (1996).
- Sandoval M. T., Pérez- Coll C. , Herkovits J. 2004. Universidad Nacional del Nordeste Argentina. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Teratogénesis y alteración del desarrollo de embriones de bufo arenarum por exposición al plomo* 2004.resumen: b-030
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191.
- Ballenge'e B., Sessions SK. 2009. Explanation for missing limbs in deformed amphibians. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 312B
- Sparling DW, Krest S, Ortiz-Santaliestra M. 2006. Effects of lead-contaminated sediment on *Rana sphenocephala* tadpoles. *Archives of environmental contamination and toxicology* 51: 458-466.

- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000; 35: 206-21.
- Vargas R. 1949. Enciclopedia de los municipios de Querétaro, Pinal de Amoles. www.inafed.gob.mx/work/templates/enciclo/queretaro/municipios/22002a.htm
- Vega G. S. 1985. Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. En: *Toxicología III. Aspectos específicos de la toxicología de algunos contaminantes*. Metepec, México: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. 1985:1-19,76-128.
- Wang M. Z., Jia X. Y. 2008. Low levels of lead exposure induce oxidative damage and DNA damage in the testes of rana nigromaculata. *Ecotoxicology* (2009) 18: 94-99.
- Wolf Ruth E. Ph.D., 2005. Research Chemist, USGS/Central Region/Crustal Imaging & Characterization Team, March 2005. What is the ICP-MS.