



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

**PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN
CIENCIAS AMBIENTALES**

**APLICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN DE RIESGO
ECOLÓGICO EN EL SISTEMA DE HUMEDALES DE COATZACOALCOS,
VERACRUZ**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA:

M. EN C. CÉSAR ARTURO ILIZALITURRI HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA

COMITÉ TUTELAR:

DR. FERNANDO DÍAZ-BARRIGA MARTÍNEZ

DR. GERARDO GOLD BOUCHOT



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

APLICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN DE RIESGO ECOLÓGICO EN EL SISTEMA DE HUMEDALES DE COATZACOALCOS, VERACRUZ

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

M. EN C. CÉSAR ARTURO ILIZALITURRI HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA

SINODALES:

PRESIDENTE:

DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA

SECRETARIO:

DR. FERNANDO DÍAZ-BARRIGA MARTÍNEZ

VOCAL:

DR. GERARDO GOLD BOUCHOT

VOCAL:

DR. IVÁN NELINHO PÉREZ MALDONADO

VOCAL:

DR. LEONARDO CHAPA VARGAS

PROYECTO REALIZADO EN:

**LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA AMBIENTAL
DE LA FACULTAD DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

CON FINANCIAMIENTO DE:

**DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN SOBRE LA CONTAMINACIÓN URBANA Y
REGIONAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA (DGICUR-INE)
[NO. DE CONVENIO INE/A1-047/2007]**

**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT)
BECA-TESIS (CONVENIO No. 182053)**

**EL DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES ESTA INCLUIDO EN EL PADRÓN NACIONAL
DE POSGRADO DEL CONACYT
(PNP-CONACYT).**

Agradecimientos

A mis padres y mis hermanos por su amor, ejemplo y apoyo incondicional.

A Donaji por tu amor y por compartir conmigo la razón de afrontar la vida.

A mis amigos: Arturo, Diana, Edna, Gaby, German, Guillermo, Jorge, Nadia, Norma, Rebeca, Rogelio y Toño los cuales se han convertido en mi segunda familia en San Luis Potosí.

Al Dr. Jesús Mejía Saavedra Salazar y al Dr. Fernando Díaz-Barriga Martínez por su gran apoyo en la realización de esta investigación y también por brindarme su conocimiento y experiencia; así como su amistad y confianza.

A mi comité tutorial y sinodales de tesis: Dr. Iván Nelinho Pérez Maldonado, Dr. Gerardo Gold Bouchot y Dr. Leonardo Chapa Vargas por sus valiosas aportaciones al trabajo de investigación y por su gran disposición.

Al grupo de Ecotoxicología y Salud Ecosistémica por las largas discusiones y sobre todo, por el trabajo conjunto que pronto nos llevará a consolidarnos como uno de los grupos más importantes de México.

A mis compañeros y profesores del laboratorio de toxicología por sus aportaciones y críticas que llevaron a enriquecer este trabajo.

Al personal técnico y administrativo del laboratorio de toxicología por dar las facilidades necesarias para la realización de este trabajo.

Al Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales (PMPCA) por la formación académica recibida.

A las poblaciones de Sapo Gigante de Coatzacoalcos, sin estos incomprendidos animalitos nada hubiera sido posible....."***espero nunca tomen venganza***".

Listado de Productos

[2010] **Ilizaliturri, C.**; González-Mille, D.; Espinosa-Reyes, G.; Díaz-Barriga, F.; Mejía-Saavedra, J. **Giant toad (*Rhinella marina*) as biomonior of lead pollution in the industrial area of Coatzacoalcos, Veracruz.** Enviado a *Ecotoxicology*. En revision por los editores.

[2010] **Ilizaliturri, C.** y González-Mille, D. **¿Cómo controlar a los peces diablo?. *Ecofronteras*.** 39:16-18.

[2010] González-Mille, D.; **Ilizaliturri, C.**; Espinosa-Reyes, G.; Costilla-Salazar, R.; Díaz-Barriga, F.; Ize-Lema, I.; Mejía-Saavedra, J. ***Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz.*** *Ecotoxicology*. DOI 10.1007/s10646-010-0508-x.

[2010] Espinosa-Reyes, G.; **Ilizaliturri, C.**; González-Mille, D.; Costilla, R.; Díaz-Barriga, F.; Mejía-Saavedra, J. **DNA Damage in earthworms (*Eisenia spp.*) as indicator of environmental Stress in the industrial zone Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico.** *Journal of Environmental Science and Health A*. 45:49-55.

[2010] Espinosa-Reyes, G.; Torres-Dosal, A. **Ilizaliturri, C.**; González-Mille, D.; Díaz-Barriga, F.; Mejía-Saavedra, J. **Wild rodents (*Dipodomys merriami*) like biomonitors in the mining sites.** *Journal of Environmental Science and Health A*. 45:82-89.

[2009] **Ilizaliturri, C.**; González-Mille, D.; Pelallo, N; Domínguez, G.; Pérez-Maldonado, I.; Mejía-Saavedra, J.; Batres, L.; Díaz-Barriga, F.; Espinosa-Reyes, G. **Revisión de las metodologías sobre evaluación de riesgos en salud para el estudio de comunidades vulnerables en América Latina.** *Interciencia*. 34(10):710-717.

[2007] Espinosa-Reyes, G., **Ilizaliturri, C.A.**, González-Mille, D.J., Pelallo, N.A., Costilla-Salazar, R., Trejo, A., Pérez-Maldonado, I.N. Mejía Saavedra, J. y Díaz-Barriga, F. **Informe técnico del estudio “Diseño y aplicación de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios contaminados de México - Caso de estudio Coatzacoalcos, Veracruz”**

[2006] Díaz-Barriga, F.; Torres, A.; Mejía, J. Espinosa-Reyes, G.; **Ilizaliturri, C.**; González, D. 2006. **Anexo 1: Método para la elaboración de estudios de evaluación e riesgo ambiental.** 67-108 pp. En: Ruíz, U. 2006. Guía técnica para orientar la elaboración de estudios de evaluación de riesgo ambiental de sitios contaminados. SEMARNAT-DGGIMAR. México, Distrito Federal. 314 p.

[2006] Díaz-Barriga, F.; Torres, A.; Mejía, J. Espinosa-Reyes, G.; **Ilizaliturri, C.**; González, D. 2006. **Anexo 2: Método para la elaboración de estudios de evaluación e riesgo ambiental cuando los receptores son seres humanos.** 109-134 pp. En: Ruíz, U. 2006. Guía técnica para orientar la elaboración de estudios de evaluación de riesgo ambiental de sitios contaminados. SEMARNAT-DGGIMAR. México, Distrito Federal. 314 p.

[2005] Torres, A.; Espinosa-Reyes, G.; **Ilizaliturri, C.**; González, D.; Razo, I.; Mejía, J.; Díaz-Barriga, F. **Desarrollo de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios peligrosos de México.** Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. 130 p. DISPONIBLE EN: http://www.ine.gob.mx/dgicur/sqre/descargas/2005_inf_final_met_integrada.pdf.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
Objetivos	4
Metodología General	4
Principales Aportes de la Investigación.....	6
Estructura de la Tesis	8
ANTECEDENTES GENERALES DEL SITIO.....	9
Descripción General del Sitio	9
Localización geográfica	9
Clima	10
Hidrología	10
Suelo	10
Flora	11
Fauna	12
Características socio-demográficas	13
Actividades Productivas en la Región	13
Industria.....	13
Agricultura y Ganadería.....	14
Contaminantes Ambientales Registrados en la Región	15
EVALUACIÓN DEL SITIO Y DE LOS RECEPTORES	18
Mapa Conceptual del Sitio	18
Selección de Contaminantes Crítico.....	20
Metales y metaloides.....	20
Compuestos Orgánicos Persistentes (COP's).....	21
Selección del Receptor Ecológico.....	23
Criterios de selección.....	23
Características generales del taxón y de la especie seleccionada	24
Selección y Análisis de las Líneas de Evidencia	27

El enfoque de peso de la evidencia	27
Selección de líneas de evidencia.....	27
Criterios de interpretación de la evidencia.....	34
Plan de Muestreo.....	35
Temporalidad y descripción general del plan de muestreo	35
Selección y descripción de los sitios de muestreo.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
Contaminación ambiental.....	41
Metales pesados.....	41
Compuestos Orgánicos Persistentes	44
Exposición a contaminantes.....	47
Compuestos Orgánicos Persistentes	47
Bioconcentración de COP's.....	52
Plomo en sangre	53
Respuestas biológicas	56
Genotoxicidad.....	56
Actividad de la δ -ALAD.....	57
Alteraciones hematológicas.....	59
Factor de condición	63
Posibles efectos	65
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO 1. TÉCNICAS DE ANÁLISIS.....	81
Metodologías de obtención y análisis de la información.....	81
Técnicas de captura de organismos.....	81
Permisos de colecta	81
Obtención de muestras ambientales.....	82
Obtención de muestras biológicas	82
Análisis de contaminantes en muestras ambientales.....	83
Métodos de análisis de biomarcadores de exposición	84
Métodos de análisis de biomarcadores de efecto.....	86
Bibliografía del Anexo.....	89

Índice de Cuadros

CUADRO 1. PRINCIPALES EMPRESAS LOCALIZADAS EN LA ZONA DE COATZACOALCOS.....	14
CUADRO 2. AGENTES TÓXICOS REGISTRADOS EN LA LITERATURA PARA LA REGIÓN DE COATZACOALCOS, VERACRUZ.	15
CUADRO 3. PLAN DE MUESTREO ETAPA 1.	35
CUADRO 4. PLAN DE MUESTREO DE LA ETAPA 2.	36
CUADRO 5. PLAN DE MUESTREO DE LA ETAPA 3.	38
CUADRO 6. NIVELES DE METALES PESADOS EN SUELO DE COATZACOALCOS VERACRUZ.....	41
CUADRO 7. CONCENTRACIONES DE COP'S EN SUELO PARA EL 1ER Y 2DO MUESTREO.....	44
CUADRO 8. CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOCOLORADOS EN TEJIDOS DE SAPO GIGANTE.....	48
CUADRO 9. CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOCOLORADOS EN DIFERENTES ESPECIES DE ANFIBIOS ADULTOS EN DIFERENTES ESTUDIOS.....	50
CUADRO 10. CONCENTRACIÓN DE PCB TOTALES EN DIFERENTES ESPECIES DE ANFIBIOS ADULTOS EN DIFERENTES ESTUDIOS.....	51
CUADRO 11. PORCENTAJE DE SAPOS GIGANTES POR INTERVALOS DE REFERENCIA PARA PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS.....	59
CUADRO 12. ANÁLISIS DETERMINÍSTICO DE LA PELIGROSIDAD HACIA LA EXPOSICIÓN A COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES EN SAPO GIGANTE PARA EFECTOS DE LETALIDAD.....	66
CUADRO 13. ANÁLISIS PROBABILÍSTICO DE LA PELIGROSIDAD HACIA LA EXPOSICIÓN A COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES EN SAPO GIGANTE PARA EFECTOS DE LETALIDAD.....	66
CUADRO 14. ANÁLISIS PROBABILÍSTICO DE LA PELIGROSIDAD HACIA LA EXPOSICIÓN A PLOMO EN SAPO GIGANTE PARA EFECTOS REPRODUCTIVOS Y HEMATOLÓGICOS.....	67
CUADRO 15. ANÁLISIS DE LÍNEAS DE EVIDENCIA DE RIESGO PARA COATZACOALCOS VERACRUZ.....	71

Índice de Figuras

FIGURA 1. METODOLOGÍA INTEGRADA DE RIESGOS	5
FIGURA 2. UBICACIÓN DE LA REGIÓN DE COATZACOALCOS, VERACRUZ	9
FIGURA 3. DIFERENTES ETAPAS EN EL PROCESO DE GENERACIÓN DEL PVC Y LAS SUSTANCIAS TÓXICAS QUE PODRÍAN GENERARSE	16
FIGURA 4. INVENTARIO DE EMISIONES PARA LA REGIÓN DE COATZACOALCOS Y NANCHITAL.....	17
FIGURA 5. MAPA CONCEPTUAL PARA EL PROCESO DE EVALUACIÓN DE RIESGO EN COATZACOALCOS VERACRUZ.....	19
FIGURA 6. EJEMPLAR ADULTO DE SAPO GIGANTE (<i>RHINELLA MARINA</i>)	25
FIGURA 7. TIPOS Y LÍNEAS DE EVIDENCIA	27
FIGURA 8. RED HIPOTÉTICA DE POSIBLES EFECTOS PRESENTADA EN LOS RECEPTORES ECOLÓGICOS. LAS ESTRELLAS PRESENTES EN EL DIAGRAMA REPRESENTAN ALGUNOS DE LOS EFECTOS SELECCIONADOS EN LA EVALUACIÓN.	30
FIGURA 9. LOCALIZACIÓN DE LOS SITIOS DE MUESTREO DE LA PRIMERA ETAPA EN EL ESTUARIO DE COATZACOALCOS	35
FIGURA 10. LOCALIZACIÓN DE LOS SITIOS DE MUESTREO DE LA SEGUNDA ETAPA EN EL ESTUARIO DE COATZACOALCOS	36
FIGURA 11. LOCALIZACIÓN DE LOS SITIOS DE MUESTREO DE LA TERCERA ETAPA.	37
FIGURA 12. NIVELES DE PLOMO EN SUELO EN DIFERENTES SITIOS DE COATZACOALCOS, VERACRUZ.....	42
FIGURA 13. NIVELES DE COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES EN SUELO DE COATZACOALCOS, VERACRUZ	44
FIGURA 14. CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES EN DIFERENTES TEJIDOS DE SAPO GIGANTE.....	47

FIGURA 15. FACTORES DE BIOCONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES EN DIFERENTES TEJIDOS DE SAPO GIGANTE DE COATZACOALCOS, VERACRUZ	52
FIGURA 16. NIVELES DE PLOMO EN SANGRE DE SAPO GIGANTE EN DIFERENTES SITIOS DE COATZACOALCOS, VERACRUZ	53
FIGURA 17. CORRELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE PLOMO EN SUELO Y DE PLOMO EN SANGRE EN SAPOS GIGANTES DE COATZACOALCOS.....	54
FIGURA 18. ACTIVIDAD DE LA ALAD EN SANGRE DE SAPO GIGANTE EN DIFERENTES SITIOS DE COATZACOALCOS, VERACRUZ	57
FIGURA 19. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE PLOMO EN SANGRE Y LA ACTIVIDAD DE LA ALAD DE SAPO GIGANTE DE COATZACOALCOS, VERACRUZ.....	58
FIGURA 20. CONTENIDO DE HEMOGLOBINA EN SANGRE DE SAPO GIGANTE EN DIFERENTES SITIOS DE COATZACOALCOS, VERACRUZ.	60
FIGURA 21. CONTENIDO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA EN SANGRE DE SAPO GIGANTE EN DIFERENTES SITIOS DE COATZACOALCOS, VERACRUZ.....	60
FIGURA 22. VALORES DE HEMATOCRITO EN SANGRE DE SAPO GIGANTE EN DIFERENTES SITIOS DE COATZACOALCOS, VERACRUZ..	61
FIGURA 23. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE PLOMO EN SANGRE Y LA HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA EN SAPO GIGANTE DE COATZACOALCOS, VERACRUZ.	61
FIGURA 24. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE PLOMO EN SANGRE Y EL HEMATOCRITO EN SAPO GIGANTE DE COATZACOALCOS, VERACRUZ.....	62
FIGURA 25. FACTOR DE CONDICIÓN DE SAPOS GIGANTES EN DIFERENTES SITIOS DE COATZACOALCOS, VERACRUZ.....	63
FIGURA 26. MODELO DE DISTRIBUCIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LAS ESPECIES A MIREX PARA EFECTOS DE LETALIDAD.....	65

Introducción

“Only when the last tree has been cut down; only when the last river has been poisoned; only when the last fish has been caught; only then will you find that money cannot be eaten”

Proverb, American Indian

La evaluación del riesgo ambiental (ERA) es un proceso que tiene como objetivo asignar magnitudes y probabilidades a los efectos adversos de la contaminación en receptores humanos y ecológicos (OPS, 1999; Suter, 2007). En consecuencia, éste proceso resulta ser un instrumento que puede utilizarse para definir si un sitio contaminado merece o no ser intervenido. Con ello, puede establecerse si el grado de contaminación presente en un sitio genera efectos nocivos; entre mayor sea el riesgo de que la contaminación afecte a los seres vivos, mayor será la necesidad de instrumentar programas de restauración.

Por razones prácticas y teórico-conceptuales, el desarrollo histórico metodológico de la evaluación de riesgo se ha desarrollado, por un lado, para evaluar salud humana (OPS, 1999) y por otro, para la evaluar a la vida silvestre o a los ecosistemas (EPA, 1998). Estas metodologías han sido uno de los principales instrumentos de la gestión ambiental del riesgo. En materia ambiental, las decisiones no pueden ser completamente adecuadas si sólo se considera de forma parcial la protección a los humanos o sólo a las otras especies biológicas, poblaciones ó ecosistemas. En muchos casos la contaminación ambiental afecta más a los receptores no humanos por presentar una mayor exposición o incluso éstos individuos resultan ser los más sensibles a los efectos negativos (Suter 1993; Aylward et al 1996; Van der Schalie et al 1999), éstas características frecuentemente conducen que

tanto los evaluadores de riesgo humano como ecológico, generen evidencias que podrían parecer contradictorias acerca de la naturaleza de los riesgos asociados a un sitio contaminado.

En la actualidad, ha surgido la necesidad y la exigencia legal de establecer mejores niveles de protección tanto al ser humano como a los otros componentes del ambiente, así como el de hacer de las metodologías de evaluación de riesgo procesos más efectivos, eficientes y sistémicos (Wayne et al 2003; INE, 2005). Las necesidades de integración de metodologías de riesgo requieren de enfoques centrados en escenarios reales que se presentan en los sitios contaminados, tales como: la presencia de mezclas de contaminantes, diferentes compartimientos ambientales, varias rutas de exposición y, principalmente el impacto simultáneo sobre los diversos receptores tanto ecológicos como humanos (INE, 2005).

Los humedales son ecosistemas caracterizados principalmente por su régimen hídrico; éstos son porciones de tierra que está temporal ó permanentemente inundada. De acuerdo con el RAMSAR, se consideran como humedales los pantanos y marismas, lagos y ríos, pastizales húmedos y turberas, oasis, estuarios, deltas y bajos de marea, zonas marinas próximas a las costas, manglares y arrecifes de coral, así como sitios artificiales como estanques piscícolas, arrozales, embalses y salinas. Los humedales bajo todas sus modalidades, son ecosistemas que prestan servicios únicos a las poblaciones humanas y aportan determinadamente al bienestar de las comunidades en donde estos se ubican; éstos asumen una importancia ecológica, económica y sociocultural desproporcionada en relación con su tamaño. Los humedales desempeñan un papel esencial en el ciclo hidrológico regional, suministran el agua necesaria para el mantenimiento de los servicios ambientales (p. ej., la diversidad biológica, captura de carbono y depuración de aguas contaminadas), para el consumo de los seres humanos, para la producción agrícola y las actividades recreativas. También, proporcionan alimentos y fibras; son centros de desarrollo económico para la industria, el transporte, la producción de alimentos y el turismo; asimismo son lugares de los que dependen especies vegetales y animales únicas. Dada su importancia de estos ecosistemas son

sujetos a presiones como sobreexplotación, contaminación y destrucción del hábitat que de manera conjunta ponen en riesgo su productividad y persistencia en el tiempo.

Como una aportación a la conservación de los ecosistemas mexicanos así como a los nuevos requerimientos de integración de la información de los riesgos asociados a la exposición de contaminantes, el grupo de toxicología ambiental de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) ha diseñado y propuesto un abordaje metodológico integrado que contempla tanto a la población humana como a los otros receptores ecológicos en un sólo proceso de evaluación (Ilizaliturri et al 2009), para de esta manera, brindar información completa, coherente y consistente que apoye la toma de decisiones y como un aporte a las estrategias de estudio, conservación y restauración de los ecosistemas mexicanos. La propuesta metodológica se describe de manera detallada en la sección de metodología general.

Para la implementación de la metodología se han elegido: 1) el sitio minero de Villa de la paz, Matehuala y; 2) el sitio industrial de Coatzacoalcos, Veracruz. El sitio minero de Villa de la paz, Matehuala está ubicado al norte del estado de San Luis Potosí. En este sitio ya se ha demostrado la existencia de contaminación por metales pesados y arsénico, así como efectos genotóxicos en receptores humanos y ecológicos y alteraciones en la composición de especies de las comunidades vegetales y animales presentes en el sitio. La región industrial de Coatzacoalcos su ubica en el sureste del estado de Veracruz. En este lugar se encuentran algunos de los complejos industriales más grandes e importantes de México y América latina. Actualmente, la cuenca baja del Río Coatzacoalcos es considerada como uno de los sitios más contaminados de México. Estudios ambientales en la región han demostrado la presencia de diversos agentes tóxicos (Cuadro 2) en los diferentes medios ambientales y en la vida silvestre derivados principalmente de las actividades industriales, comerciales y agropecuarias de la región (Rosales-Hoz and Carranza-Edwards 1998; Bahena-Manjarrez et al 2002; Rosales Hoz et al 2003; Bozada and Bejarano, 2006).

Objetivos

El objetivo general de esta investigación es la aplicación de una metodología para evaluar el riesgo ecológico en la fauna de los humedales de Coatzacoalcos, Veracruz. Para la consecución del objetivo general se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Seleccionar organismos silvestres para su uso como bioindicadores ambientales en el proceso de evaluación de riesgo.
- Seleccionar los biomarcadores de exposición y de efecto en los grupos animales seleccionados.
- Estandarizar los métodos de laboratorio para analizar los biomarcadores.
- Evaluar el estado general de salud de los individuos a través de biomarcadores de exposición y efecto.
- Integrar los efectos biológicos con la exposición a contaminantes.

Metodología General

En el esquema de la Figura 1 se muestran las diferentes etapas que componen la metodología integrada de riesgos. Aunque a continuación se describe con detalle el proceso general de evaluación, cabe señalar que esta investigación se enfoca únicamente en el escenario ecológico y particularmente en el ecosistema de humedal.

En la primera etapa de la metodología se genera un modelo de sitio, tomando en cuenta las condiciones del área y los tóxicos presentes. Se establecen las principales rutas de exposición y se definen las poblaciones receptoras. Para los humanos la definición como población receptora se basa en los puntos de exposición a los contaminantes, para la biota, dado el gran número de especies susceptibles al riesgo, la determinación y selección de las especies críticas es un punto clave. En esta fase se toman como criterios de selección: la facilidad de captura, el tipo de contaminante, las rutas y vías potenciales de exposición, el conocimiento de la biología de

las especies, la posición en la red trófica, el estatus de conservación, el grado de exposición a contaminantes, los factores de vulnerabilidad fisiológicos o del comportamiento que aumenten la exposición o la absorción de contaminantes.

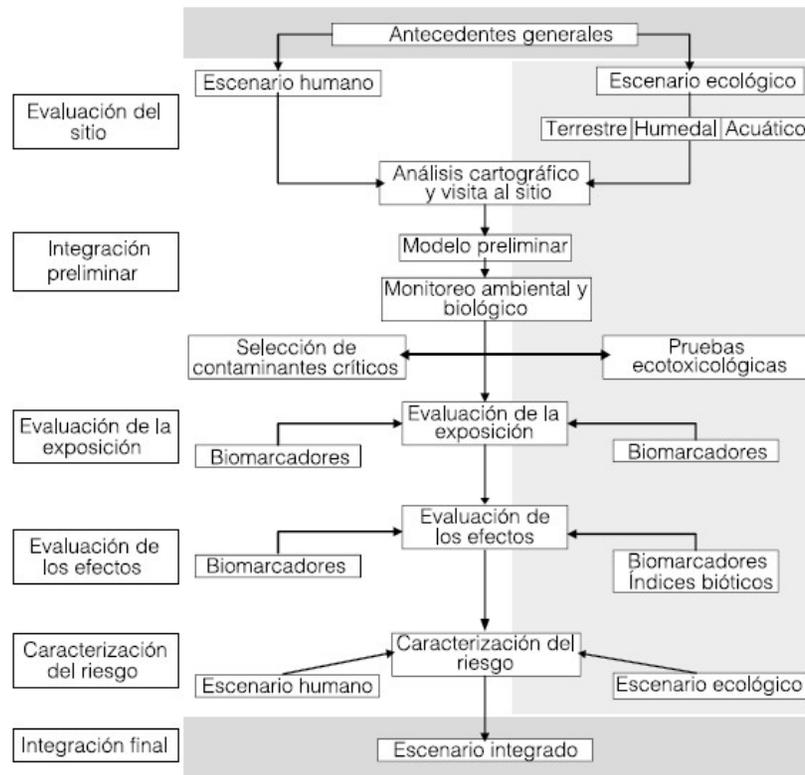


Figura 1. Metodología integrada de riesgos (Ilizaliturri et al 2009).

En la siguiente etapa se evalúa la exposición en los diferentes receptores a través de: i) un monitoreo ambiental, con el fin de determinar concentraciones de los contaminantes presentes en el sitio y ii) biomarcadores de exposición. Ambas evaluaciones son de utilidad para el establecimiento de un gradiente de concentración y/o para la elección de sitios de referencia. Para el caso de la biota, para muchas especies no es posible encontrar valores de referencia, y por lo tanto se deben generar mediante modelos toxicológicos o por la comparación con valores tóxicos de referencia (TRV´s por sus siglas en ingles).

Posteriormente se evalúan los efectos en las poblaciones en riesgo, para lo cual se utilizan biomarcadores de efecto (genotóxicos, endócrinos, etc.). Para la evaluación de los efectos en niveles de organización biológica superiores en el escenario ecológico (individuo, población y comunidad) se toman en cuenta características generales de los individuos, parámetros poblacionales e índices bióticos para la comunidad.

Enseguida se realiza la caracterización del riesgo en los diferentes escenarios. Es aquí donde se propone la caracterización integrada del riesgo que permite la asignación conjunta de las magnitudes de los efectos adversos en el sitio de estudio. La caracterización de riesgo se realiza a través del juicio conjunto de las líneas de evidencia seleccionadas en el estudio; estas líneas pueden ser representadas por los efectos, las concentraciones de contaminantes en el ambiente o los biomarcadores de exposición (Ver Página 27-Selección y Análisis de las Líneas de Evidencia).

En los siguientes capítulos se describirá con más detalle la aplicación de esta metodología en la presente investigación.

Principales Aportes de la Investigación

Los enfoques tradicionales de evaluación de la salud de los ecosistemas aplicados en el área de Coatzacoalcos, han puesto mayor énfasis en la evaluación de los componentes abióticos (suelo, sedimentos, agua y aire) y en menor grado en la exposición de los organismos a los contaminantes (Ruelas-Inzunza et al 2007; Ruelas-Inzunza et al 2009). Estos esquemas de monitoreo ambiental aunque son útiles, han demostrado ser insuficientes porque carecen de información acerca de los posibles efectos en la biota residente.

Desde el punto de vista ecotoxicológico, la exposición a contaminantes no siempre resulta en efectos letales en la biota, sino que también se pueden producir efectos subletales sutiles a diferentes niveles de organización biológica que pueden eventualmente influir en la viabilidad de las poblaciones en el largo plazo (Triebkorn et al 2001, Moraes et al 2003).

En este sentido, la presente investigación aporta en las siguientes vertientes del conocimiento:

- Apoya el diseño de una propuesta metodológica de evaluación integrada de riesgos práctica y flexible que permita su aplicación en diferentes escenarios de contaminación ambiental a nivel nacional.
- Evalúa el estado de la contaminación ambiental actual en la región de Coatzacoalcos.
- Caracteriza los riesgos en los ecosistemas de la región de Coatzacoalcos para proveer de un mejor entendimiento de los efectos de la contaminación sobre las poblaciones naturales de los humedales, convirtiéndose en una herramienta de diagnóstico ambiental para el diseño de estrategias de control y prevención de la contaminación.
- Genera conocimiento básico sobre los efectos tóxicos de los contaminantes en anfibios de la región de Coatzacoalcos.
- Propone organismos como bioindicadores para ser utilizados en programas de monitoreo de contaminantes a nivel nacional.
- Identifica incertidumbres, vacíos de información e interrogantes que permitan la generación de nuevos proyectos para la región.

Estructura de la Tesis

El presente documento se compone de cuatro capítulos, un anexo y un apartado de referencia bibliográficas.

En el **primer capítulo** se presenta la descripción general de la región de Coatzacoalcos, así como los antecedentes sobre las actividades productivas y los principales estudios e investigaciones sobre contaminación ambiental disponibles para el área.

El **segundo capítulo** comprende el abordaje metodológico para la realización de la evaluación de riesgo. En esta sección, se presentan todos los criterios de selección de contaminantes, sitios, receptores, líneas de evidencia, biomarcadores de exposición y efecto.

El **tercer capítulo** consta de la descripción, integración y análisis de la información. También, en este capítulo se identifican e interpretan los riesgos y sus posibles implicaciones en la salud de los receptores evaluados.

El **capítulo quinto** muestra las conclusiones y recomendaciones más importantes que surgen de la realización de esta investigación.

En el **anexo 1** se describen los métodos y técnicas para la obtención y análisis de la información.

"Human consciousness arose but a minute before midnight on the geological clock. Yet we mayflies try to bend an ancient world to our purposes, ignorant perhaps of the messages buried in its long history. Let us hope that we are still in the early morning of our April day"

Stephen Jay Gould

Descripción General del Sitio

Localización geográfica

La zona de Coatzacoalcos se localiza al sureste del Estado de Veracruz en el municipio del mismo nombre, a 18° 8' 56" de latitud Norte y 94° 24' 41" de longitud Oeste(Figura 2); la altitud promedio es de 14 msnm.

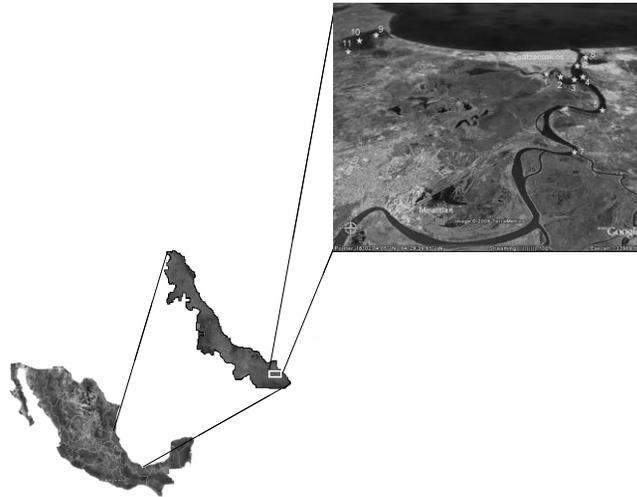


Figura 2. Ubicación de la región de Coatzacoalcos, Veracruz.

Coatzacoalcos se encuentra en la Provincia Fisiográfica de la Llanura Costera del Golfo y en la Subprovincia Llanuras y Pantanos Tabasqueños. En esta porción los sistemas de relieve representativos son las llanuras costeras inundables y los valles de ladera tendida (Cecodes 1988).

Clima

El clima predominante es tropical lluvioso [Am (i´) gw"], con temperatura media del mes más frío mayor de 18 °C (García, 1988). La temperatura media anual es de 24.5 °C, la temperatura media del mes más caliente (mayo) llega a los 27.9 °C y la temperatura media del mes más frío (enero) es de 22.1 °C. La precipitación media anual es de 2780.1 mm. En la zona se pueden distinguir tres temporadas: lluvias, secas y eventos extraordinarios (García, 1988).

Hidrología

El río Coatzacoalcos, el cual tiene una extensión 322 km es la principal corriente superficial. En temporada de lluvias la intrusión salina en el río llega hasta los 22 km aguas arriba. Su temperatura oscila entre los 21.7°C a 33.3°C. En el área también existen otras corrientes de menor tamaño y magnitud como el río Calzadas y los arroyos Copalapa, Teapa y Tepeyac, los cuales desembocan en el río Coatzacoalcos (López-Portillo 2000).

Suelo

Los principales tipos de suelo en el área son Gleysol, Regosol, y Solonchak, sus características generales son las siguientes:

Gleysoles. Son suelos formados por la condición de inundación, tienen un drenaje deficiente. Con abundante vegetación típica de esas condiciones de humedad. Yacen sobre roca caliza suave, arcillosos a través del perfil de

colores grisáceo y otros amarillentos, ocasionalmente con manchas, muy plásticos y chiclosos. Son ricos en materia orgánica.

Regosol. Se caracterizan por no presentar capas distintas. En general son de tono claro, se encuentran en las playas, dunas y en mayor o menor grado en las laderas de las sierras, muchas veces acompañados de litosoles y de roca o tepetate. Su fertilidad es variable y su uso agrícola está condicionado principalmente a su profundidad y a la pedregosidad que presenten.

Solonchak. Se caracterizan por presentar un alto contenido de sales en alguna porción del suelo o en su totalidad. Su uso agrícola está limitado a cultivos muy resistentes a las sales. El uso pecuario de estos suelos depende de la vegetación que sostienen; sin embargo, los rendimientos son bajos. Tienen poca susceptibilidad a la erosión.

Flora

Los tipos de vegetación predominantes son: vegetación acuática (manglar, popal y tular), selva alta perennifolia (remanentes), pastizal y vegetación de dunas costeras (Gómez-Pompa 1980). La distribución y su composición florística de estos tipos de vegetación se resumen a continuación:

Manglar. Vegetación que se desarrollan en las lagunas costeras y a lo largo de ríos cerca de su desembocadura al mar. Las especies vegetales que dominan en este tipo de vegetación son: *Languncularia racemosa*, *Avicenia germinans*, *Rhizophora mangle* y *Conocarpus erectus* (Rzedowski, 1978).

Popal. Vegetación herbácea en partes someras de cuerpos de agua en zonas costeras. Se presenta en lugares pantanosos o inundados que se saturan con agua permanente por filtración y/o inundaciones, con una profundidad aproximada de un metro o menos. Las especies más comunes son *Calathea* sp., *Thalia* sp. y *Heliconia* sp. (Rzedowski *op cit*).

Tular. Vegetación acuática dominada por plantas de 1 a 3 m de alto, de hojas angostas y alargadas, que se desarrollan sobre la llanura de

inundación. Se forma principalmente por especies de *Typha* sp. (Rzedowski *op cit*).

Selva alta perennifolia. Vegetación arbórea de 30 m o más de altura en climas cálido húmedos, con estación seca breve o sin estación seca, menos del 25 % de los árboles pierden follaje a lo largo del año (Rzedowski *op cit*).

Pastizal. Su principal característica es la dominancia de gramíneas (pastos o zacates). Se distingue por presentar árboles esparcidos que crecen en suelos con poco drenaje. Algunas de las especies dominantes son: *Acisanthera quadrata*, *Acrocomia mexicana*, *Andropogon altus*, *Cassia diphylla*, *Crotalaria sagittalis*, *Hibiscus costatus*, *Mimosa pudica*, *Paspalum pectinatum*, *Rhynchospora mexicana*, *R. barbata*, *Setaria geniculata*, *Zexmenia aurea* (Rzedowski *op cit*).

Vegetación de dunas costeras. Se desarrolla sobre suelos con exceso de sales. Las dunas costeras de arenas móviles carecen de vegetación, pero al disminuir esta movilidad se ven invadidas por diferentes especies que las fijan y estabilizan (Rzedowski *op cit*)

Fauna

Posiblemente la cuenca baja del río Coatzacoalcos fue una de las regiones de mayor riqueza biológica en el país. Un listado de especies potencialmente presentes en la región incluye 656 especies de vertebrados, de las cuales son: 36 de anfibios, 103 de reptiles, de 426 aves y 91 de mamíferos (Hall y Dalquest, 1963; Herzig 1986; Aranda y March, 1987; Citados por: Pelcastre y Flores-Villela, 1992). Los anfibios constituyen el 12.2% del total nacional, los reptiles el 14.6%, las aves el 42.2% y los mamíferos el 19.5% (Flores y Gerez, 1994). Los humedales del Río Coatzacoalcos forman parte del gran sistema de humedales del sur del estado de Veracruz. De acuerdo con el RAMSAR, estos humedales se pueden clasificar principalmente como marinos, ribereños y palustres. En los manglares del Río Coatzacoalcos y sobre todo en algunos de los afluentes, se encuentran ejemplares de cocodrilo de pantano (*Crocodylus*

moreletti); además también, se encuentran las 6 especies de tortugas de agua dulce en la zona (*Chelydra. Serpentina*, *Trachemys scripta*, *Kinosternon acutum*, *K. leucostomum*, *K. scorpioides*, *Staurotypus triporcatus*). También, cabe destacar la presencia de especies de anfibios terrestres y acuáticas.

Características socio-demográficas

El municipio de Coatzacoalcos, Veracruz está conformado por 157 comunidades con una población total de 280,363 habitantes. Los complejos petroquímicos se localizan a unos 7 kilómetros de la ciudad de Coatzacoalcos (234,174 habitantes).

De acuerdo al tabulado IMM 2000 de CONAPO el municipio de Coatzacoalcos, Veracruz, tiene un grado de marginación muy bajo (-1.41). EL 55.34% de la población percibe hasta dos salarios mínimos, el 98.3% de la población cuenta con servicio de drenaje y el 90.55% con agua entubada, de acuerdo a la misma fuente. Aproximadamente el 30% de la población total del municipio corresponde a habitantes de 0-14 años (INEGI, 2005).

Actividades Productivas en la Región

Industria

En el municipio se han establecido diversas industrias entre las cuales se encuentran 39 microempresas, dentro de estas hay 21 que fabrican productos con calidad de exportación. Destacan la presencia de la industria petroquímica secundaria de fabricación de químicos y polietileno. En este rubro PEMEX Petroquímica se encarga de la elaboración, almacenamiento, distribución y comercialización de todos los productos petroquímicos secundarios. Los complejos de PEMEX Petroquímica en Coatzacoalcos son considerados como los más grandes e importantes de México y Latinoamérica; su producción en conjunto (Cosoleacaque, Cangrejera,

Morelos y Pajaritos) es de aproximadamente 1.6 miles de millones de toneladas/año de productos petroquímicos (Morales et al 2006).

Además, en la zona están instaladas varias industrias relacionadas con los procesos químicos y con la producción del monómero de cloruro de vinilo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales empresas localizadas en la zona de Coatzacoalcos.

Empresas	Tipo	Productos	Estado
PEMEX -Complejo Cangrejera -Complejo Morelos -Complejo Pajaritos	Petroquímica	Aromáticos y solventes Productos derivados del gas natural y derivados de Etileno Cloruro de vinilo	En operación
CELANESE Mexicana	Petroquímica	Acetilos, solventes, acrilatos, aminas y especialidades	En operación
FERTIMEX	Fertilizantes	Ureas, sulfatos de amonio, nitratos de amonio y productos fosfatados	Dejó de operar en el 2000.
TEMSA (Tetraetilo de México)	Química	Tetraetilo de Pb y Br	Dejó de operar en 1997
IQUISA	Química	Sosa cáustica, Hipoclorito de Sodio, Cloro.	En operación
Cloro de Tehuantepec	Química	Sosa cáustica, Hipoclorito de Sodio, Cloro.	En operación
Industrias Resistol	Química	Adhesivo	En operación

Fuente: Bozada y Bejarano 2006.

Agricultura y Ganadería

El municipio cuenta con una superficie total de 13,400.770 ha, de las cuales se siembran 7,022.722 ha. Los principales productos agrícolas y la superficie correspondiente en hectáreas que se cosecha son maíz, frijol y arroz. Existen 306 unidades de producción rural con actividad forestal, de las que 85 se dedican a productos maderables (INEGI 1994). La superficie dedicada a la ganadería es de 15,279 ha, en ella se ubican 448 unidades de producción rural con actividad de cría y explotación de animales. Cuenta con 23,151 cabezas de ganado bovino, además de la cría de ganado porcino, ovino y equino (INEGI 1994).

Contaminantes Ambientales Registrados en la Región

El área industrial de Coatzacoalcos, Veracruz fue establecida en la década de los sesenta en los márgenes del estuario del Río Coatzacoalcos, con ello, el estuario ha experimentado un rápido crecimiento industrial y poblacional que aunado a otras actividades productivas como la agricultura y la ganadería, han desencadenado un severo impacto en los ecosistemas de la región (Macauley et al 2007). Actualmente, la cuenca baja del Río Coatzacoalcos es considerada como uno de los sitios más contaminados de México. Estudios ambientales (Cuadro 2) en el área se han demostrado la presencia de hidrocarburos, compuestos orgánicos volátiles, contaminantes orgánicos persistentes y metales pesados (Bozada and Bejarano, 2006; Rosales-Hoz and Carranza-Edwards 1998; Bahena-Manjarrez et al 2002; Rosales-Hoz et al 2003).

Cuadro 2. Agentes tóxicos registrados en la literatura para la región de Coatzacoalcos, Veracruz.

Agente tóxico	Matriz	referencia
METALES As, Pb, Zn, Cd, Mn, Ni, Co, Cu, Cr, V y Hg	Suelo Sedimentos Tejido <i>(Fauna acuática)</i>	(Stringer et al 2001) (Bozada y Namihura, 2005) (Rosales y Carranza, 2005) (Vázquez-Botello y Paez, 1986) (Vázquez-Botello et al, 2004)
HIDROCARBUROS Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP's) Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's)	Agua Sedimentos Tejido <i>(Fauna acuática)</i>	(Vázquez-Botello y Paez, 1986) (Celis et al 1987)
COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (COV's) 1,2 dicloroetano, tricloroetano, tetracloroetano, cloruro de vinilo, tetracloruro de carbono	Agua Sedimentos	(Stringer et al 2001)
COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES (COP's) Hexaclorobenceno, aldrín, endrín, DDT, heptacloro, lindano y PCB's	Sedimentos Huevos de gallina	(Vázquez -Botello y Páez, 1986) (Blake, 2005)
COMPUESTOS BROMADOS	Huevos de gallina	(Blake, 2005)
DIOXINAS	Huevos de gallina	(DiGangi y Petrlik, 2005)

Dentro de los principales productos que se generan en los complejos industriales de Coatzacoalcos está el monómero de cloruro de vinilo (MVC), la materia prima principal para generar el cloruro de polivinilo (PVC) que se utiliza en la fabricación de diferentes tipos de plásticos. En la Figura 3 se muestra el proceso para la generación de MVC y PVC y las sustancias tóxicas que podrían liberarse en las diferentes fases del proceso.

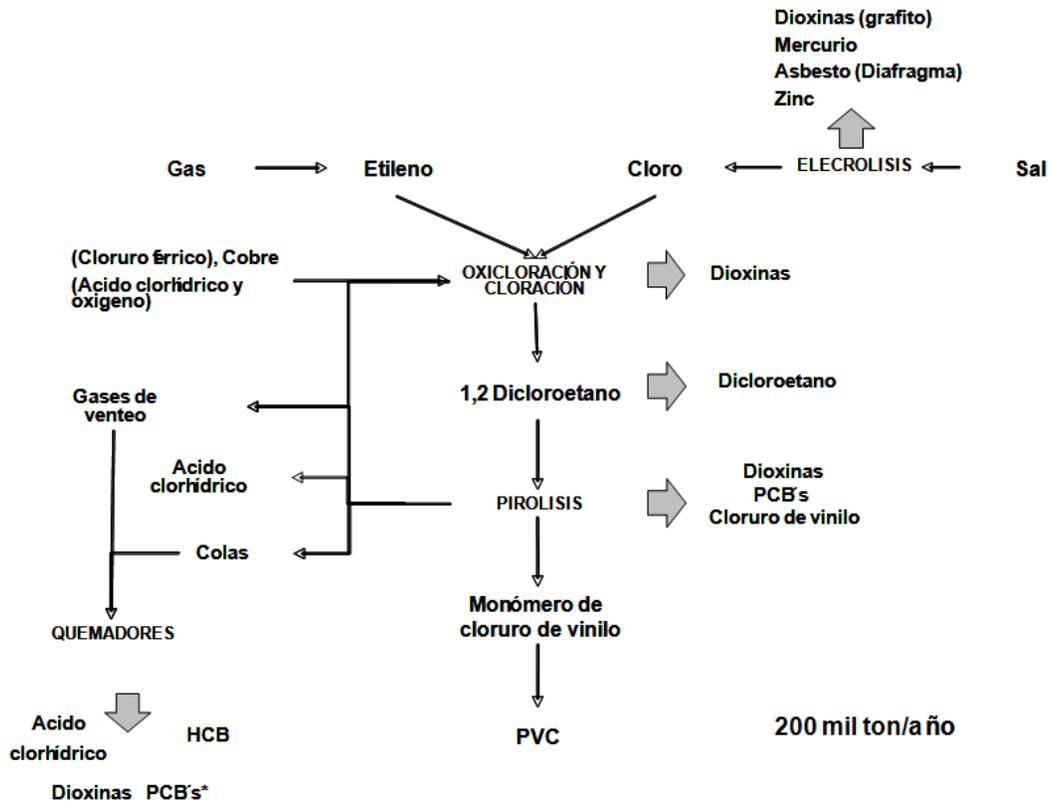


Figura 3. Diferentes etapas en el proceso de generación del PVC y las sustancias tóxicas que podrían generarse (Basado en Bozada y Bejarano, 2006).

De acuerdo al inventario de emisiones y transferencia de contaminantes (2004) de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales las cantidades anuales vertidas hacia agua y aire por el total de actividades industriales en Coatzacoalcos y Nanchital se muestran en la Figura 4. Cabe destacar que las emisiones se componen principalmente de metales pesados, compuestos orgánicos volátiles y gases de efecto invernadero.



Figura 4. Inventario de emisiones para la región de Coatzacoalcos y Nanchital.

Cabe mencionar que actividades industriales pasadas pueden ser de fuente de exposición actual debido a la liberación de contaminantes residuales en el ambiente (principalmente del suelo y los sedimentos), al respecto se encuentra la empresa Tetraetilo de México (TEMSA) que operó hasta el año 1997. Esta empresa era la única en el país en la producción de tetraetilo de plomo (utilizado como aditivo antidetonante para las gasolinas) y que pudo haber sido una fuente de contaminación industrial importante para la región (Flores and Albert, 2004). Por otro lado Coatzacoalcos está ubicada en una zona endémica de paludismo; en México, el DDT fue utilizado intensamente durante tres décadas (de los 50`s a los 70`s) con fines agropecuarios y de salud pública. Debido que este compuesto es altamente persistente, es muy probable que al igual que el plomo, se libere al ambiente con la resuspensión de los sedimentos

Evaluación del Sitio y de los receptores

"We forget that the water cycle and the life cycle are one"

Jacques Cousteau

Mapa Conceptual del Sitio

La primera integración cuando se realiza una evaluación de riesgo consiste en construir un modelo conceptual tomando como base la información disponible en la literatura especializada para el sitio. El mapa conceptual, es una herramienta que nos apoya en la identificación de los posibles contaminantes presentes en el ambiente, así como sus potenciales rutas de exposición en los diferentes receptores (Suter, 2007). La Figura 5 representa de manera esquematizada a los principales componentes del ecosistema en estudio de Coatzacoalcos (terrestre, acuático y humedal), los principales medios ambientales (agua, aire, suelo y sedimentos), las interacciones tróficas de los diversos receptores y las probables rutas de exposición más importantes. Cabe mencionar que el mapa conceptual representa rutas de exposición que no son específicas, la importancia y relevancia de las rutas dependerá principalmente del tipo de contaminante; por ejemplo, las rutas relacionadas con la ingesta podrían ser más relevantes en el estudio de contaminantes persistentes. En la Figura 5 se observa que las poblaciones de anfibios de Coatzacoalcos podrían estar en riesgo debido al grado de exposición y su ciclo de vida. Las etapas tempranas del desarrollo de los anfibios son acuáticas y se ha observado que pueden absorber los contaminantes disueltos en el agua por las branquias y la piel (Sparling et al 2000; Hopkins, 2007), posteriormente,

las etapas adultas están expuestas a otros tipos de contaminantes principalmente por vía inhalatoria e ingesta (*Op Cit*). Como se muestra en el mapa conceptual, los anfibios son el vínculo entre los ecosistemas terrestres y acuáticos por lo que pueden ser rutas de exposición secundarias importantes para los peces, aves y mamíferos de la región. Al igual que los anfibios la población humana podría estar en riesgo, por lo que la integración de la población vulnerable a la evaluación de riesgo es determinante.

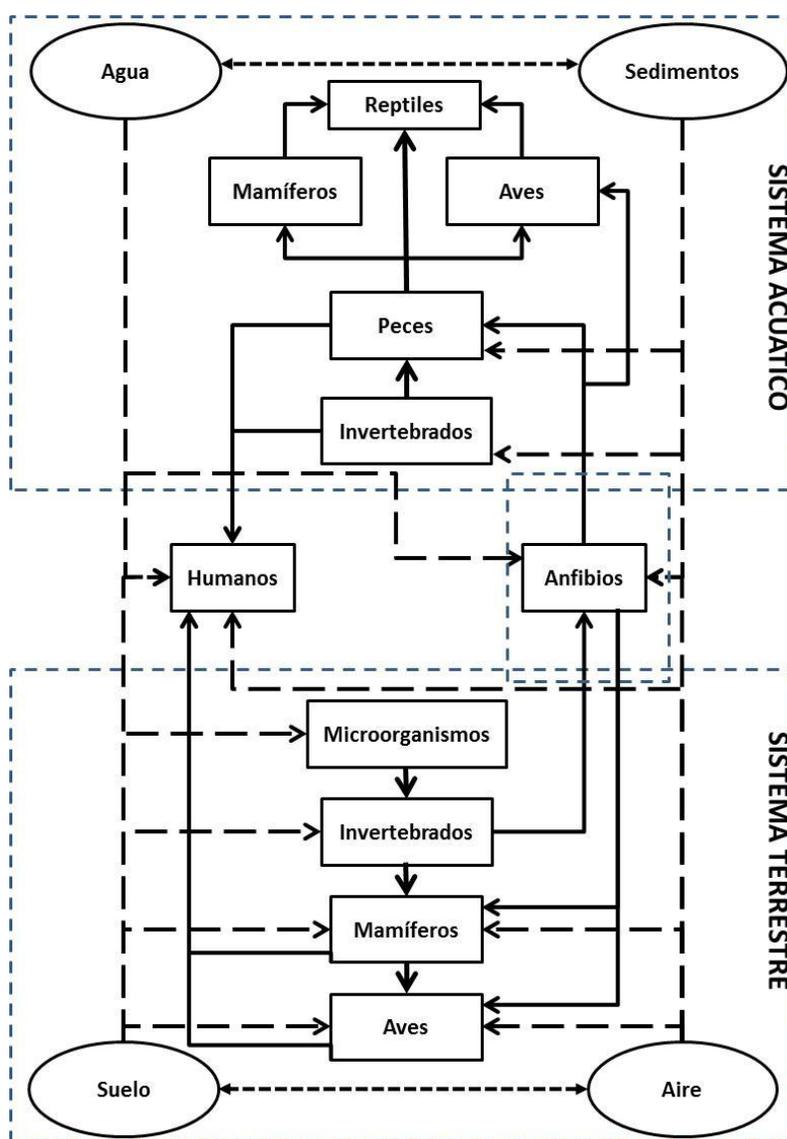


Figura 5. Mapa conceptual para el proceso de evaluación de riesgo en Coatzacoalcos Veracruz (Las líneas punteadas representan las rutas de exposición relacionadas con algún compartimento ambiental y las líneas sólidas son las que están relacionadas con la ingesta).

Selección de Contaminantes Críticos

Un contaminante crítico es aquel que por su concentración y/o toxicidad puede representar un riesgo para el ambiente (INE, 2005). La selección de los contaminantes críticos para la región de Coatzacoalcos se realizó primeramente haciendo un listado de acuerdo a lo reportado en la literatura (Cuadro 2, Figura 5) y los probables contaminantes derivados de las actividades de la región (Figura 3). La lista se sometió a selección para valorar solamente a los contaminantes que realmente podrían representar un riesgo para el sitio en estudio. Se consideraron factores como: la comparación ente las concentraciones ambientales y los valores de referencia (normas y guías ambientales); la preocupación de la comunidad por el contaminante; el factor de bioconcentración; la capacidad de biomagnificación, la persistencia ambiental; las características toxicológicas; la presencia del contaminante en todos los medios; la capacidad técnica para determinar los compuestos y el presupuesto destinado para realizar la investigación. Los contaminantes considerados como críticos para la región de Coatzacoalcos son los metales pesados y los Compuestos Orgánicos Persistentes (COP's).

Metales y metaloides

Los metales son elementos conductores de la electricidad, flexibles y con brillo. Algunos de ellos son esenciales para los seres vivos ya que se utilizan como cofactores en moléculas biológicamente activas. Sin embargo pueden llegar a ser tóxicos en función de la concentración y de la forma química del metal. Algunos de los metales y metaloides considerados importantes desde el punto de vista del riesgo ambiental son: mercurio, plomo, cadmio, cromo, arsénico, cobre, níquel, plata, selenio, manganeso y zinc.

Los metales se encuentran en forma natural en la corteza terrestre. Estos se pueden convertir en contaminantes si su distribución en el ambiente se altera mediante actividades humanas. En general esto puede ocurrir durante la extracción minera, el refinamiento de productos mineros o por la

liberación al ambiente de efluentes industriales y emisiones vehiculares. Además, la inadecuada disposición de residuos metálicos también ha ocasionado la contaminación del suelo, agua superficial y subterránea y de ambientes acuáticos.

Los metales pueden bioacumularse, pero típicamente no se biomagnifican (excepto el mercurio orgánico). Los factores que controlan la biodisponibilidad de los metales son la cantidad del carbono orgánico, la salinidad, la cantidad de carbonatos y sulfuros, el pH y la temperatura. La acumulación de metales en biota puede ser resultado del contacto directo con el cuerpo -dérmico- o de las estructuras respiratorias -inhalatorio- y a través del consumo de alimento -oral-.

Compuestos Orgánicos Persistentes (COP's)

De acuerdo con el IPEN (International POPs Elimination Network, por sus siglas en inglés), los COP's son un grupo de compuestos que se caracterizan por ser: a) *Persistentes*. Resistentes en grado variable a la descomposición biológica, química y fotolítica, así como de mantenerse en el ambiente por periodos de tiempo prolongados. Estos compuestos pueden alcanzar una vida media de hasta más de 2 meses en el agua y más de 6 meses en el sedimento. Son bioacumulables y biomagnificables, los factores de bioconcentración (BAF) pueden llegar a ser mayores de 5000 y con valores de $K_{ow} > 5$. Tienen la capacidad de transportarse por efecto saltamontes a lugares remotos de la fuente, principalmente por sus características fisicoquímicas y la vida media de estos compuestos, que en el aire, pueden llegar a ser superiores a los 2 días; b) *Orgánicos*. Su estructura está basada en cadenas de carbono, típicamente en moléculas complejas y; c) *Contaminantes*. Tóxicos y presentes a niveles superiores a los naturales. Existe evidencia sobre los efectos (o potenciales efectos) de estos compuestos en humanos y en el ambiente.

Los agentes tóxicos contemplados dentro de este grupo son: 1) Plaguicidas. HCB, α -HCH, β -HCH, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Heptaclor, Hexaclorobenceno, Clordano, Toxafeno y Mirex; 2) Químicos industriales: Bifenilos policlorados (PCB's) y; 3) Derivados de la producción: Policloro dibenzo-dioxinas y Policloro dibenzo-furanos.

La distribución de estos compuestos en el ambiente está determinada por las características fisicoquímicas del compuesto, las propiedades del compartimiento ambiental en donde está presente, la susceptibilidad a la degradación y las características del receptor (Buccini, 2003; Zitko, 2003a,b).

En general, en estos compuestos el número de cloros en su estructura molecular determina de forma directa la estabilidad, liposolubilidad, bioacumulación, solubilidad, volatilización, adsorción a partículas y lixiviación del suelo y el sedimento. A causa de la baja polaridad y estabilidad en su estructura, estos compuestos son poco reactivos y muy resistentes a la degradación biológica y fotoquímica, sin embargo los productos de resultado del metabolismo pueden ser de mayor peligrosidad que el compuesto original (Albert, 1996, Buccini, 2003; Walker, 2009).

La absorción de los COP's ocurre principalmente por vía inhalatoria, dérmica y oral. Los principales sitios de depósito son los tejidos ricos en grasa, como el hígado, el sistema nervioso, la médula ósea, los riñones y el tejido adiposo. La excreción de COP's es lenta lo que contribuye a su acumulación (Albert, 1996, Walker, 2009).

Selección del Receptor Ecológico

Criterios de selección

Para estudiar los efectos de los contaminantes en los ecosistemas de humedal de Coatzacoalcos se realizó una priorización de especies críticas. Una especie crítica es aquella que tiene un papel crucial en la dinámica del ecosistema y además presenta algún tipo de importancia para el hombre (económica, cultural, científica, etc.) y, además que pudiera tener una alta vulnerabilidad a los contaminantes o ser indicativa de la presencia de estos (Suter, 2007; INE, 2005; Ilizaliturri et al 2009).

A continuación se presentan los criterios de apoyo para la selección de especies candidatas a evaluar:

- *Tipo de contaminantes presentes en el sitio.* El transporte y destino del contaminante en el ambiente está determinado en gran medida por sus características fisicoquímicas; el conocimiento de estas características puede ser de utilidad en la identificación de las posibles rutas de exposición y los compartimentos ambientales afectados. También es importante considerar que diversos estudios ecotoxicológicos han demostrado la sensibilidad de ciertos grupos de contaminantes en receptores ecológicos específicos (ej. Los inhibidores de la colinesterasa y las aves, los PCB's y los mamíferos). La presencia de contaminantes en el sitio y los efectos tóxicos de las especies candidatas se determinaron con base en literatura.
- *Las probables rutas de exposición* (ingesta, inhalación y dérmica) que dependerán del comportamiento ambiental de los contaminantes. Una vez determinados los contaminantes y las probables rutas de exposición, es posible determinar qué especies podrían ser las más expuestas.
- *Biología bien conocida* (dieta, nicho ecológico, amplitud de hábitat, época reproductiva, longevidad y hábitos de conducta).

- Talla. Principalmente por los requerimientos de muestra en las técnicas de cuantificación de contaminantes así como para la realización de biomarcadores de efecto.
- *Facilidad de captura y manejo.*
- *Posición en la cadena trófica* (particularmente importante en contaminantes persistentes y con alto potencial de biomagnificación) con la finalidad de lograr una mejor caracterización de la magnitud del impacto ecológico y su posible afectación a la población humana.

Características generales del taxón y de la especie seleccionada

Para la realización de la evaluación de riesgo se seleccionó al grupo de los anfibios como organismos bioindicadores de las condiciones del ambiente debido a las características asociadas a su metabolismo, ciclo de vida y ecología (Sparling et al 2000; Hopkins, 2007). Durante las últimas décadas las poblaciones de anfibios han disminuido globalmente (Collins and Storfer, 2003, Linder et al 2003). De esta manera el monitoreo de las poblaciones de anfibios ha adquirido gran relevancia en la evaluación de la contaminación ambiental (Banerjee, 1991; Venturino et al 2003; Burger, 2006). Los humedales de Coatzacoalcos se caracterizan por ser ricos en especies de anfibios. Dentro de estas especies destaca la presencia del sapo gigante (*Rhinella marina* antes conocido como *Bufo marinus*, Figura 6).

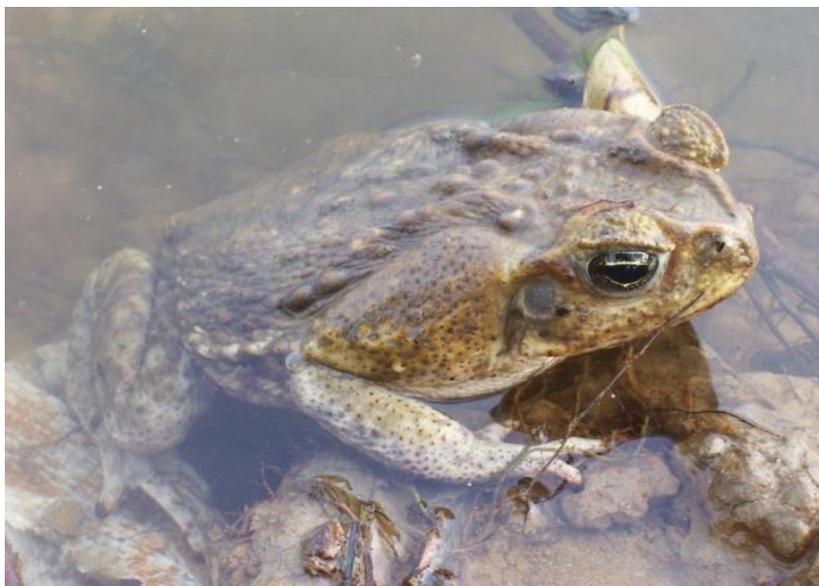


Figura 6. Ejemplar adulto de sapo gigante (*Rhinella marina*).

Las características que justifican la selección del sapo gigante como biondicador son las siguientes:

- *Muy amplia distribución*, por lo que es factible realizar estudios comparativos en múltiples áreas, estados, e inclusive países (Centroamérica y Sudamérica) donde su distribución es natural y en países donde ha sido introducido (EUA y Australia). En México, se encuentra muy bien representado en zonas tropicales y costeras (Zug and Zug, 1979).
- *Importancia ecológica*. Aunque no existen estudios poblacionales de esta especie, en nuestra experiencia, es una especie muy abundante en áreas no perturbadas (hemos estimado densidades de hasta 50 ind/h) por lo que podrían exceder el número de otros vertebrados terrestres. En el estadio adulto su alimentación es principalmente de invertebrados, por lo que son un importante vínculo (energético) entre los insectos y otros vertebrados (Sparling et al 2000). Finalmente, siendo uno de los anfibios de mayor talla corporal, muy abundante y con alimentación primariamente de invertebrados es uno de los principales reguladores de las poblaciones de insectos (razón por lo cual fue introducido a otros lugares del mundo) por lo

que brinda un servicio ambiental muy importante en el ámbito de salud pública y en el de producción animal y vegetal (Evans and Lampo, 1996).

- *Talla corporal.* Una de las limitantes en los estudios de determinación de contaminantes, es la cantidad de tejido requerido en las técnicas analíticas; El sapo gigante es uno de los anfibios con distribución en México de mayor talla corporal (Zug and Zug, 1979); las hembras pueden llegar a pesar hasta 5 Kg, por lo que es factible la obtención de suficiente sangre y tejidos.
- *Estatus de conservación.* El sapo no se encuentra protegido por la normatividad mexicana y el uso científico del organismo o cualquiera de sus partes está permitido.
- *Facilidad de captura e identificación de sexo.* La captura de los organismos de esta especie solo requiere de una red y de contenedores. Al ser una especie con dimorfismo sexual, los sexos pueden ser claramente identificados por su morfología externa.
- *Estudios previos.* Diversos estudios identifican a esta especie como un bioindicador de los sistemas acuáticos en la evaluación de la contaminación del aire (Dohm et al 2008), la presencia de enfermedades infecciosas (Zupanovic et al 1998), compuestos organoclorados (Linzey et al 2003) y disruptores endocrinos (McCoy et al 2008). Es un organismo comúnmente usado como bioensayo en estudios fisiológicos, bioquímicos.

Selección y Análisis de las Líneas de Evidencia

El enfoque de peso de la evidencia

El enfoque de peso de la evidencia es el proceso por el cual se interpreta la información generada durante la evaluación de riesgo, considerando criterios sistemáticos y a juicio del experto para determinar la validez y las incertidumbres de las inferencias de causalidad entre los factores estresantes y los efectos biológicos (Morales et al 2003; Suter, 2007). El enfoque de peso de la evidencia se realiza sobre líneas de evidencia, las cuales son inferencias de la relación entre dos eventos (causa y efecto). Para el caso de la evaluación de riesgo, las relaciones entre los efectos y las potenciales causas generalmente se analizan desde el concepto de ruta de exposición; el cual puede ser definido como el transporte de un contaminante desde su liberación o generación hasta la absorción y el efecto en el organismo. En la Figura 7 se muestran los tipos y líneas de evidencia más comunes para la evaluación de riesgo ecológico.

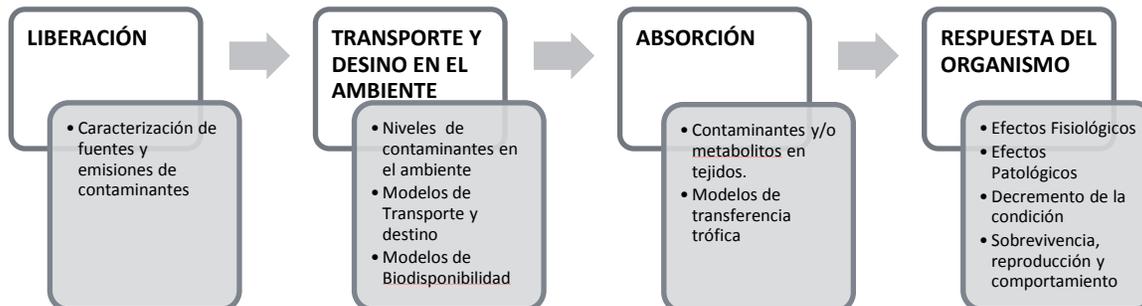


Figura 7. Tipos y líneas de evidencia

Selección de líneas de evidencia

La selección de líneas de evidencia se realizó de acuerdo al concepto de ruta de exposición. Debido a que no se conocen muchas de las fuentes y el acceso a algunas de ellas están restringidas, las líneas de evidencia correspondientes a la liberación de contaminantes no fueron tomadas en cuenta. A continuación, se describen con detalle las líneas de evidencia contempladas en el estudio.

Contaminación ambiental

La presencia de contaminantes en los diferentes compartimentos ambientales puede ser considerada como potencialmente peligrosa para los ecosistemas y los receptores residentes en las áreas afectadas. Generalmente, los organismos de vida silvestre están en contacto directo con las matrices ambientales contaminadas y por ello manifiestan de manera temprana efectos biológicos relacionados con la calidad del ambiente. La identificación y cuantificación de contaminantes en el ambiente suele ser la primera línea de demostración de medios afectados en los estudios de riesgo; su evaluación aunado al uso de umbrales de referencia y/o ensayos de toxicidad pueden ser de utilidad para la identificación de la peligrosidad y/o calidad de las matrices biológicas afectadas.

Exposición a contaminantes

La identificación de los contaminantes en tejidos o fluidos biológicos es indicativo de contacto (exposición) del receptor con los contaminantes (INE, 2005). La exposición en el organismo implica la biodisponibilidad del contaminante, así como de la capacidad del mismo para traspasar las barreras biológicas y de distribuirse en los órganos del receptor. La cuantificación de contaminantes en los receptores se realiza a través de biomarcadores de exposición; estos nos son útiles para integrar e identificar la carga corporal de contaminantes provenientes de diversas rutas de exposición y para establecer los posibles efectos en la salud asociados a los niveles encontrados (EPA, 1998; OPS, 1999). Cabe señalar que existen factores extrínsecos (ambientales), intrínsecos (del individuo) y propios del contaminante (características fisicoquímicas) que modifican la concentración y la distribución de los contaminantes en los tejidos; factores como el metabolismo, los mecanismos de desintoxicación celulares y la excreción, la edad, la alimentación, la tasa metabólica, entre otros, influyen finalmente en la toxicidad del contaminante y por lo tanto en la aparición de efectos biológicos (Oakley et al 1996).

Respuestas de los organismos

Las respuestas biológicas hacia los contaminantes pueden evaluarse a través de la medición de biomarcadores de efecto. Se definen a los biomarcadores de efecto como "una alteración inducida por un xenobiótico en componentes o procesos, estructuras o funciones celulares o bioquímicas, que es susceptible de medición en un sistema o muestra biológica"; es decir son medidas bioquímicas, fisiológicas, etológicas, o alteraciones en el organismo completo, que dependiendo de su magnitud pueden ser reconocidas como deterioro de la salud o una enfermedad. Existe una gran variedad de efectos reportados en biota asociados a la exposición de una amplia gama de contaminantes, la elección de los biomarcadores para esta investigación se realizó en función de la mezcla de contaminantes reportada en los estudios previos para el sitio (Ver Cuadro 2), de receptor seleccionado, de la red hipotética de efectos que podrían presentarse en el receptor y del presupuesto destinado.

Además de los criterios antes mencionados se identificó una red de efectos (Figura 8) que podrían presentarse en el receptor seleccionado, con la finalidad de orientar en la selección de las baterías de biomarcadores de efectos. En el diagrama se observa que los contaminantes se distribuyen en los diferentes órganos del individuo y ocasionan diversas respuestas en función de su mecanismo de toxicidad (ej. DDT, As y Cd pueden generar radicales libres, el Pb ocasiona inhibiciones enzimáticas, los PCB's pueden incrementar las reacciones bioquímicas relacionadas con el metabolismo de tipo I).

La alteración o desequilibrio de las funciones celulares o bioquímicas en los órganos y sistemas, derivadas de exposiciones crónicas a mezclas de contaminantes a bajas concentraciones pueden desencadenar efectos a nivel organismo o sistémico como alteraciones nutricionales, conductuales, reproductivas y de crecimiento que pueden poner en riesgo la sobrevivencia del individuo.

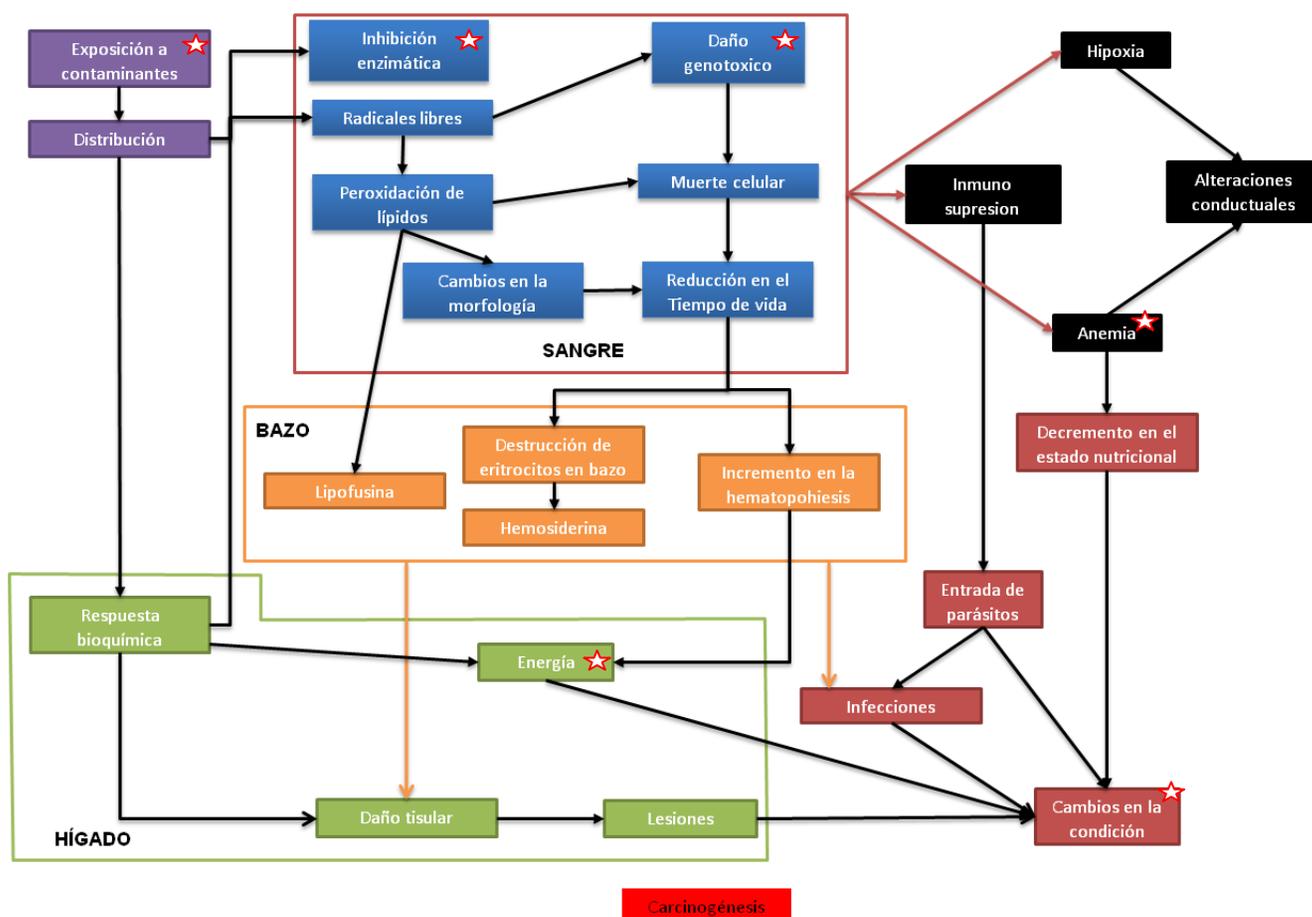


Figura 8. Red hipotética de posibles efectos presentada en los receptores ecológicos. Las estrellas presentes en el diagrama representan algunos de los efectos seleccionados en la evaluación.

A continuación se describen los efectos biológicos seleccionados como líneas de evidencia de respuesta de los organismos a los contaminantes.

Daño al ADN.

Todos los componentes básicos del ADN (bases nitrogenadas, azúcares y grupos fosfodiésteres) son posibles blancos de alteraciones químicas por agentes genotóxicos como los Compuestos Orgánicos Persistentes -ej. DDT, lindano-, los hidrocarburos aromáticos policíclicos -ej. hidroxi-pireno- y los metales -ej. cadmio- (Gaskell M et al 2005).

La teoría de la mutación somática del cáncer establece que los daños del genoma que producen mutaciones son la base para el desarrollo de varios tipos de cáncer. De manera tal, que el daño en el sitio adecuado y que no sea reparado correctamente, puede tener consecuencias severas para la célula (Shugart, 200). De manera general el daño genotóxico se puede subdividir en: 1) mutagénesis puntual; 2) rupturas y aberraciones cromosómicas y, 3) daño y fragmentación del ADN.

La fragmentación del ADN puede ser medida a través del ensayo cometa y es aplicable a estudios de biomonitorio de vida silvestre (Collins et al 2008). Se caracteriza por ser un método sensible, rápido, sencillo, de bajo costo y aplicable a varios tipos de células eucariotas (Mckelvey-Martin et al 1993; Speit y Hartmann, 1999). La técnica de Singh et al., (1988) bajo condiciones de lisis y electroforesis alcalina ($\text{pH} > 13$) permite analizar la migración del ADN debido a rupturas en la hebra simple del ADN y sitios álcali-lábiles (Speit y Hartmann 1999). El ensayo cometa se utiliza ampliamente para detectar en células individuales, el daño al ADN causado por agentes genotóxicos, ya sean químicos o físicos (Rojas et al., 1999, Tice et al., 2000; Lee y Steinert, 2003). La técnica ha sido principalmente utilizada en el estudio del daño genético inducido por plaguicidas y otros mutágenos ambientales en humanos, aunque su uso en especies silvestre ha sido una de sus actuales aplicaciones (Rojas et al., 1999; Espinosa-Reyes et al; 2010). Cabe mencionar que el ensayo cometa como biomarcador puede ser influenciado por cambios en las variables ambientales y por factores intrínsecos.

Inhibición de la biosíntesis del grupo hemo

La síntesis de protoporfirina y del grupo hemo son procesos centrales para producción de hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalasas y peroxidasas. Contaminantes inorgánicos (ej. As, Pb, Hg) y orgánicos (ej. TCDD, PCB, lindano) pueden interferir con la síntesis del grupo hemo. Actualmente, la inhibición de la actividad de la enzima ácido delta aminolevulínico deshidratasa (δ -ALAD) es uno de los biomarcadores más

importantes y reconocidos de respuesta temprana de toxicidad por plomo; y ha sido descrita en seres humanos y otros vertebrados (Sakai y Morita 1996). La inhibición de la δ -ALAD puede acarrear alteraciones en la síntesis de protoporfirina IX y hemoglobina, lo que finalmente ocasiona cuadros de anemia (Schwartz et al; 1990).

Alteraciones hematológicas

Estas respuestas han sido ampliamente utilizadas en el monitoreo de la vida silvestre, debido a la facilidad de obtención de la sangre y como indicador general del estado fisiológico del organismo (Romero-Almaráz et al 2000). La evaluación de parámetros hematológicos en estudios ecotoxicológicos es muy variada; estas incluyen parámetros como: hematocrito, concentración de hemoglobina, conteos diferenciales de células (ej. eritrocitos, leucocitos, trombocitos), concentración de iones, hormonas, etc. Los procedimientos para la cuantificación de estos parámetros están bien estandarizados, son fáciles para aplicar en campo y requieren de poca cantidad de muestra biológica (Peri 1998b; Rosenberg et al 1998). Aunque las respuestas hematológicas pueden estar influenciadas por muchas variables biológicas y ambientales, estas han sido de utilidad en estudios de campo y se han relacionado efectos como la anemia o supresión del sistema inmune en los organismos con la exposición a contaminantes (ej. Cadmio, Plomo, Cobre, Aldrin, Clordano, etc).

Alteraciones en la condición

Los contaminantes pueden interferir con los procesos de adquisición y absorción de nutrimentos así como en las tasas de crecimiento y reproducción de los organismos (Lieven y Ronny, 2003). El crecimiento representa la integración de la alimentación, la asimilación y el gasto energético a través de un periodo de tiempo. El decremento en la energía disponible incide negativamente en el crecimiento y en la reproducción de los organismos; por lo tanto éstos pueden servir como indicadores del

bienestar general del organismo (Goede y Barton; 1990; Stevenson y Woods, 2006). El Factor de Condición (FC), se ha utilizado para comparar las condiciones de crecimiento de diversos organismos bajo diferentes condiciones ambientales; de esta manera, un factor de condición alto puede reflejar una buena calidad o poco estrés ambiental (Nash et al 2006). El índice Hepatosomático (HSI) proporciona información sobre el estado de las reservas de energía del organismo almacenadas en el hígado. El HSI es considerado como un biomarcador apropiado para contaminantes que afectan el hígado (ej. cadmio) o por aquellos que se metabolizan en el hígado (Pereira et al 1993). Cabe mencionar, que los diferentes índices no sólo son sensibles a la contaminación sino que pueden verse afectados por otros factores como la temperatura y la disponibilidad de alimentos.

Posibles efectos en el crecimiento, la sobrevivencia y/o la fecundidad

Cuando no se cuenta con suficiente información sobre los posibles efectos de los contaminantes en un organismo y se conoce su carga corporal (mediante biomarcadores de exposición), la respuesta puede ser inferida o extrapolada mediante las respuestas de otra especie. Este tipo de extrapolación se lleva a cabo con modelos estadísticos construidos con umbrales de diversos efectos (crecimiento, reproducción y sobrevivencia) evaluados en especies sensibles en el laboratorio (Wang et al 2008). Los modelos de la distribución de la sensibilidad de las especies (SSD`s) utilizan diversos umbrales de referencia (ej. LC_{50} , NOAEL) posteriormente, con un modelo de regresión logística estima la concentración a la cual cierta fracción de especies expuestas no presentan efectos adversos o se presentan en una proporción aceptable (usualmente el 5%), llamada concentración peligrosa del 5%. Las HC_5 calculadas en el proceso se comparan de manera directa con los valores de exposición o la carga corporal para estimar el riesgo de la presencia de efectos.

Criterios de interpretación de la evidencia

Para establecer las posibles relaciones causales entre la presencia de contaminantes y los efectos observados en los organismos se utilizaron los siguientes criterios (Modificados de Fox 1991 en Moraes et al 2003; Suter 2007) para analizar cada línea de evidencia:

- *Fuerza*. La asociación es considerada como fuerte si: 1) las diferencias en las respuestas (medias o medianas) de los organismos entre los sitios expuestos y no expuestos es de al menos el 20%, 2) existen diferencias estadísticamente significativas en las respuestas (medias o medianas) de los organismos entre los sitios expuestos y no expuesto y/o; 3) si las concentraciones observadas en matrices ambientales o biológicas son mayores a los valores de referencia o umbrales publicados en la literatura.
- *Consistencia*. La asociación es considerada como consistente cuando los resultados de diferentes muestras (ej. diferentes años), especies (ej. peces, anfibios), sitios (ej. alta baja exposición), casos (ej. otros estudios) , y otros autores han mostrado el mismo patrón de respuesta observado.
- *Gradiente*. La evidencia de una respuesta biológica en gradiente es corroborada cuando se observa una relación espacial de concentración-respuesta; explícitamente, cuando la proporción de organismos afectados en los sitios de alta exposición es mayor en comparación con los de menor exposición.
- *Plausibilidad*. La relación causal es considerada biológicamente plausible cuando el mecanismo causa-efecto esta descrito en la literatura.
- *Especificidad*. La asociación es considerada específica cuando no existe otro factor que podría causar el mismo efecto.
- *Analogía*. La asociación es considerada análoga cuando existen otros casos u otros investigadores que han observado la relación entre la exposición a otros contaminantes y el mismo efecto bajo consideración.

Plan de Muestreo

Temporalidad y descripción general del plan de muestreo

El muestreo de la región de Coatzacoalcos se realizó en tres etapas. La primera se llevó a cabo en Enero de 2006 en 6 sitios de la región (Figura 9). Esta etapa se consideró como un muestreo de tipo exploratorio y se centró principalmente en la caracterización química de muestras de suelo. El plan de muestreo se presenta en el Cuadro 3, y en el *Anexo 1* se describen las técnicas detalladas de obtención y análisis de la información.

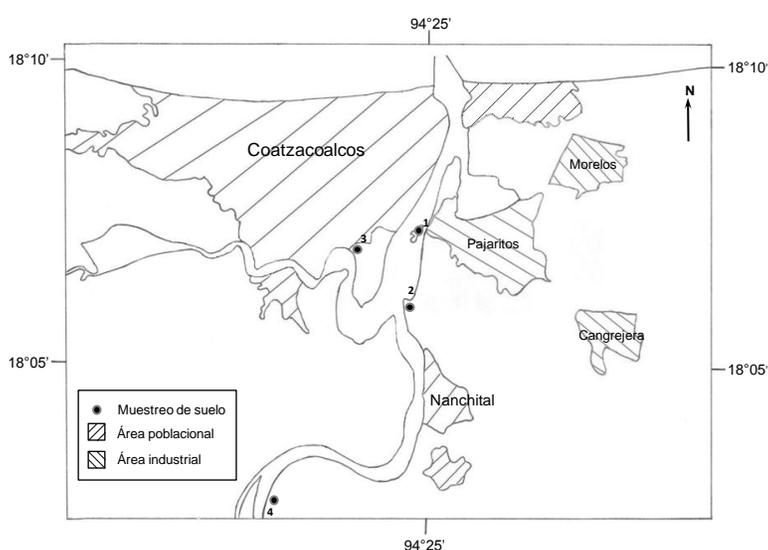


Figura 9. Localización de los sitios de muestreo de la primera etapa en el estuario de Coatzacoalcos. Sitios: 1 Copalapa, 2 Punta Brava, 3 terranova, 4 Puente II, 5 Huazutlán y 6 Laguna del Ostión. El sitio 5 y 6 no se muestran en la figura debido a que no se encuentran en el área.

Cuadro 3. Plan de muestreo etapa 1.

LÍNEA DE EVIDENCIA	CONTAMINANTE (n)	PARAMETROS DE MEDICIÓN
Contaminación ambiental	Compuestos Orgánicos Persistentes (8 muestras compuestas de suelo)	α -, β -, γ -hexaclorocyclohexano, Hexaclorobenzeno, Aldrin, Mirex, α -, γ -clordano, Oxiclordano, Trans, cis-nonaclor, Heptacloroepoxido, p,p' -DDT, p,p' -DDE. PCB's (IUPAC No. 17, 18, 28, 31, 33, 44, 49, 52, 70, 74, 82, 87, 95, 99, 101, 105, 110, 118, 128, 132, 138, 149, 151, 153, 156, 158, 169, 170,171, 177, 180,183, 187, 191, 194, 195, 201, 205, 206, 208 y 209).
	Metales y metaloides (8 muestras compuestas de suelo)	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, V, Zn.

Aplicación de una metodología de evaluación de riesgo ecológico en el sistema de humedales de Coatzacoalcos, Veracruz.

La segunda etapa se llevó a cabo en Octubre de 2006 en 9 sitios de la región (Figura 10); en esta etapa se realizó la caracterización química de muestras de suelo y se evaluó la exposición a contaminantes y efectos en sapos residentes de dos sitios de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos (Cuadro 4).

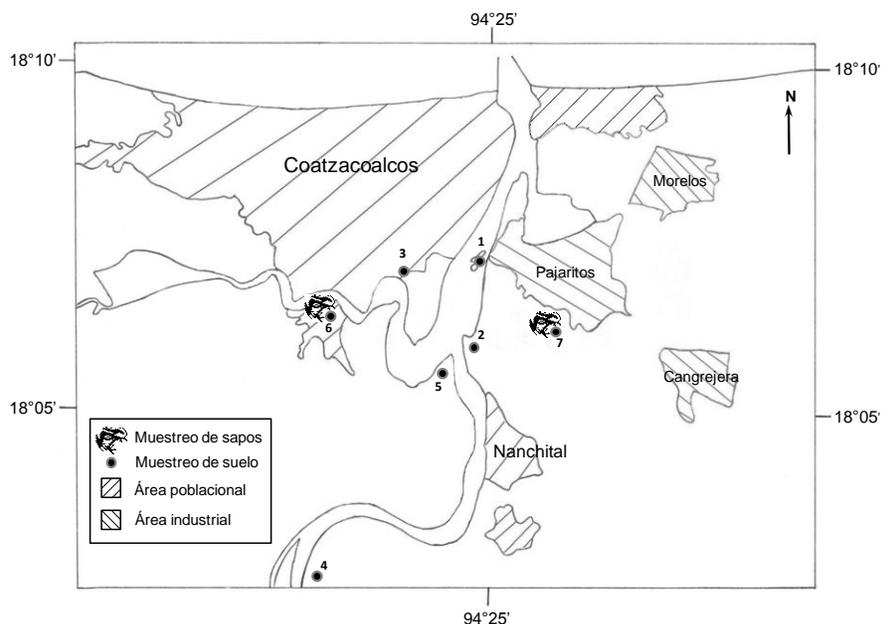


Figura 10. Localización de los sitios de muestreo de la segunda etapa en el estuario de Coatzacoalcos. Sitios: 1 Copalapa, 2 Punta Brava, 3 terranova, 4 Puente II, 5 Punta Brava, 6 Estero del Pantano y 7 Mundo Nuevo.

Cuadro 4. Plan de muestreo de la etapa 2.

LÍNEA DE EVIDENCIA	CONTAMINANTE/ EFECTO (n)	PARAMETROS DE MEDICIÓN
Contaminación ambiental	Compuestos Orgánicos Persistentes (9 muestras compuestas de suelo)	α -, β -, γ -hexaclorociclohexano, Hexaclorobenzeno, Aldrin, Mirex, α -, γ -clordano, Oxiclordano, Trans, cis-nonaclor, Heptacloroepoxido, p,p' -DDT, p,p' -DDE. PCB's (IUPAC No. 17, 18, 28, 31, 33, 44, 49, 52, 70, 74, 82, 87, 95, 99, 101, 105, 110, 118, 128, 132, 138, 149, 151, 153, 156, 158, 169, 170, 171, 177, 180, 183, 187, 191, 194, 195, 201, 205, 206, 208 y 209).
Exposición	Compuestos Orgánicos Persistentes (6 muestras compuestas hígado, musculo, tejido graso y sangre)	α -, β -, γ -hexaclorociclohexano, Hexaclorobenzeno, Aldrin, Mirex, α -, γ -clordano, Oxiclordano, Trans, cis-nonaclor, Heptacloroepoxido, p,p' -DDT, p,p' -DDE. PCB's (IUPAC No. 28, 52, 99, 101, 105, 118, 128, 138, 153, 156, 170, 180, 183, 187).
Efectos	Genotoxicidad (12 muestras)	Ensayo cometa en sangre.

La tercera etapa se realizó en Mayo del 2008 en 7 sitios del área de estudio (Figura 11). En esta etapa se colectaron muestras ambientales y biológicas para la cuantificación de contaminantes así como también se evaluaron diversos efectos en los sapos gigantes residentes en los sitios (Cuadro 5). El área considerada para el muestreo fue más amplia y se incluyeron sitios de la cuenca alta del Río Coatzacoalcos. Para el análisis de los datos de esta fase los sitios fueron agrupados conforme al tipo de actividad productiva y acorde al grado de urbanización con fines de comparación. En esta fase se utilizaron los sitios rurales como sitios de referencia con el fin de comparar con los sitios que presentaban contaminación evidente.

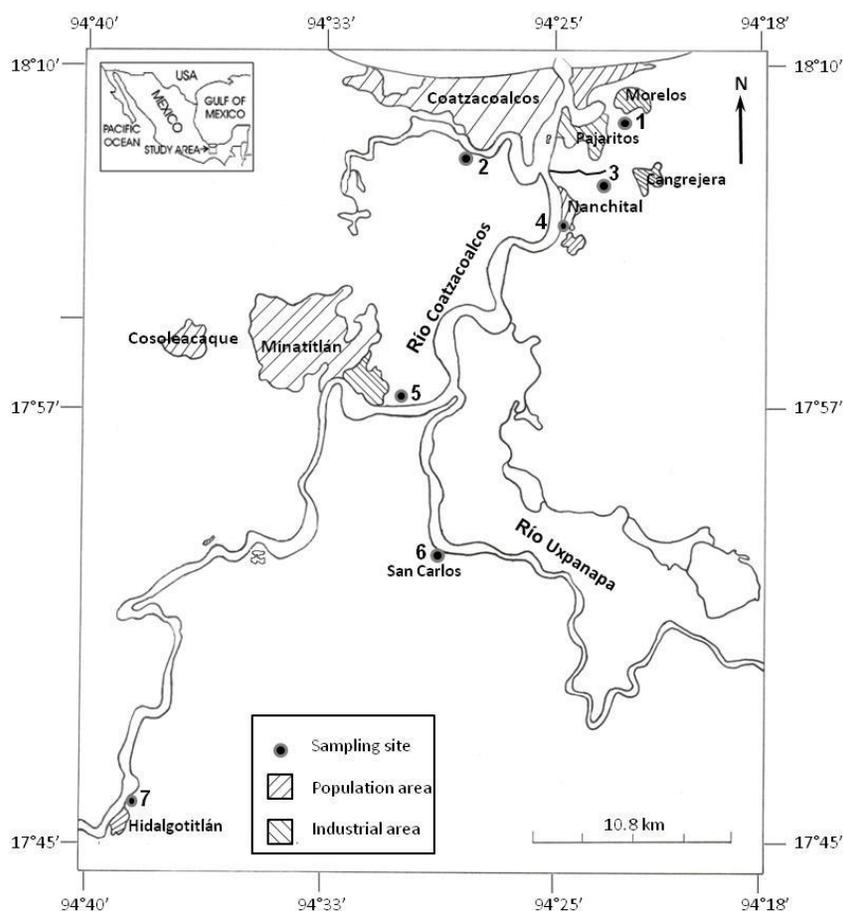


Figura 11. Localización de los sitios de muestreo de la tercera etapa. Sitios Industriales (1 Ejido Cangrejera, 5 Santa Alejandrina); Sitios urbano industriales (2 Estero del Pantano, 3 Mundo Nuevo, 4 Nanchital) y sitios rurales (6 San Carlos, 7 Las Palomas).

Cuadro 5. Plan de muestreo de la etapa 3.

LÍNEA DE EVIDENCIA	CONTAMINANTE/ EFECTO (n)	PARAMETROS DE MEDICIÓN
Contaminación ambiental	Compuestos Orgánicos Persistentes (21 muestras compuestas de suelo)	α -, β -, γ -hexaclorociclohexano, Hexaclorobenceno, Aldrin, Mirex, α -, γ -clordano, Oxiclordano, Trans, cis-nonaclor, Heptacloroepoxido, p,p' -DDT, p,p' -DDE. PCB's (IUPAC No. 17, 18, 28, 31, 33, 44, 49, 52, 70, 74, 82, 87, 95, 99, 101, 105, 110, 118, 128, 132, 138, 149, 151, 153, 156, 158, 169, 170,171, 177, 180,183, 187, 191, 194, 195, 201, 205, 206, 208 y 209).
	Compuestos Orgánicos Persistentes (140 muestras hígado y musculo)	α -, β -, γ -hexaclorociclohexano, Hexaclorobenceno, Aldrin, Mirex, α -, γ -clordano, Oxiclordano, Trans, cis-nonaclor, Heptacloroepoxido, p,p' -DDT, p,p' -DDE. PCB's (IUPAC No. 28, 52, 99, 101, 105, 118, 128, 138, 153, 156, 170, 180,183, 187).
Exposición	Metales pesados (70 muestras)	Plomo en sangre.
	Genotoxicidad (70 muestras)	Ensayo cometa en sangre.
Efectos	Inhibición de la biosíntesis del grupo hemo (70 muestras)	Actividad de la enzima delta aminolevulínico deshidratasa (δ -ALAD).
	Alteraciones hematológicas (70 muestras)	Hemoglobina, hematocrito, hemoglobina crepuscular media.
	Cambios en la condición (70 muestras)	Factor de condición.

Selección y descripción de los sitios de muestreo

La selección de sitios presentados anteriormente se realizó de acuerdo a los siguientes criterios: 1) antecedentes en la literatura sobre la presencia de contaminantes en matrices ambientales, 2) cercanía con alguna posible fuente de contaminación, 3) distancia a las fuentes más importantes (complejos industriales, campos de cultivo, desarrollos urbanos, etc.), 4) acceso a sitio, 5) presencia de los organismos.

Los sitios pueden ser agrupados conforme al tipo de actividad productiva y acorde al grado de urbanización para fines de comparación. Las características de los sitios de muestreo se presentan a continuación:

- Ejido Cangrejera. El sitio colinda con los complejos petroquímicos Pajaritos y Cangrejera donde se producen compuestos derivados del etileno y del cloro, así como el Monómero de Cloruro de Vinilo y Compuestos Orgánicos Volátiles (COV).
- *Las Palomas*. Se ubica río arriba del Río Coatzacoalcos, en el municipio de Hidalgotitlán; el sitio tiene escasa urbanización y presenta ecosistemas aún bien conservados. El sitio no presenta fuentes de contaminación industrial evidentes.
- *San Carlos*. Ubicado en la rivera del Río Uxpanapa, uno de los principales afluentes del Río Coatzacoalcos, y considerado como uno de los prioritarios para la conservación de la vida silvestre de la región. El sitio no presenta fuentes de contaminación industrial evidentes.
- Santa Alejandrina. Sitio adyacente a la refinería "General Lázaro Cárdenas del Río" en Minatitlán, donde se producen productos energéticos ($\approx 220,000$ barriles/diarios) y petroquímicos (2500 barriles/diarios PEMEX, 1999).
- Isla Copalapa. Ubicada en la vertiente del Arroyo Teapa, el principal cuerpo de agua impactado por la actividad industrial. El sitio presenta contaminación por Compuestos Orgánicos Volátiles y metales pesados (Stringer et al., 2001).
- *Punta brava e Intersección*. Sitios conservados por su grado de inaccesibilidad; sin embargo el sitio se encuentra próximo a las zonas urbanas e industriales.

- *Terranova*. Sitio de astilleros abandonados y efluentes de industria de alimentos.
- *Puente 2 y Brazo Huazutlán*. Sitios de implementación de tecnologías para la contención de fugas de hidrocarburos.
- *Mundo Nuevo*. Situado a 10 km al sur del complejo petroquímico Pajaritos. En este sitio se han detectado contaminantes importantes como las dioxinas y el hexaclorobenceno (Stringer et al., 2001).
- *Nanchital*. Localizado en la orilla del Arroyo Nanchital a 10 km al sureste de la refinería de Minatitlán; se caracteriza por una historia de frecuentes derrames de hidrocarburos.
- *Estero del pantano*. Ubicado en las márgenes del Río Calzadas a 15 km al este de los complejos petroquímicos Pajaritos y Cangrejera; el Río recibe aportes de aguas residuales de los núcleos urbanos e industriales aledaños. En este lugar se ha detectado la presencia de Compuestos Orgánicos Persistentes, metales pesados y contaminantes microbiológicos.

Resultados y Discusión

CAPITULO 3

"You must be the change you wish to see in the world"

Mahatma Gandhi

Contaminación ambiental

Metales pesados

Los metales pesados y metaloides presentes en las muestras de suelo de Coatzacoalcos para el primer muestreo fueron As, Be, Cd, Cr VI, Hg, Ni, Pb y, V (Cuadro 6). Los niveles de los metales cuantificados no revelaron concentraciones elevadas en relación a la Norma NOM-147-SEMARNAT/SSA-2004 que establece los niveles de metales en suelo y otras guías ambientales internacionales (Canadian Environmental Quality Guidelines, CEQG).

Cuadro 6. Niveles de metales pesados (mg/kg) en suelo de Coatzacoalcos Veracruz.

Sitio	Al%	As	Be	Cd	Cr VI	Cu	Hg	Mn	Ni	Pb	V
Terranova	1.26	5	0.5	<0.5	22	26	0.18	78	10	13	44
Punta Brava	0.47	<2	<0.5	<0.5	10	6	0.05	45	4	6	15
Isla Copalapa	1.63	6	0.6	<0.5	29	26	0.12	230	16	11	43
Puente II	2	4	0.7	<0.5	33	29	0.08	491	25	19	52
Laguna del Ostión 1	0.91	7	<0.5	<0.5	13	4	<0.01	162	11	2	19
Brazo Huatzutlán	3.4	4	<0.5	<0.5	100	74	0.24	115	35	6	186
CEQG (mg/kg) **	NR	5.9	NR	0.6	37.3	35.7	0.17	NR	NR	35	NR
NOM-Uso agrícola/residencial*	NR	22	150	37	280	NR	23	NR	1600	400	550
NOM-Uso industrial*	NR	260	1900	450	510	NR	310	NR	20000	750	7200

* Norma Oficial Mexicana **NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004**, que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por As, Be, Cd, Cr VI, Hg, Ni, Pb y, V.
** Guías ambientales de Canadian Sediment Quality Guidelines for the protection of Aquatic Life.
NR: No se tiene referencia para este metal.

Aplicación de una metodología de evaluación de riesgo ecológico en el sistema de humedales de Coatzacoalcos, Veracruz.

Debido a las concentraciones tan bajas de metales se decidió no seguir considerando a éstos (a excepción del plomo, ver abajo) como contaminantes prioritarios para la evaluación de riesgo y se omitieron de los muestreos posteriores.

Debido a los antecedentes históricos de producción de Tetraetilo de plomo en la región, la evaluación de los niveles de plomo en suelo se realizó en una tercera fase. Las concentraciones de plomo en suelo en el área de estudio del Río Coatzacoalcos variaron de 4.7 a 23.5 mg/kg (media= 11.1 mg/kg). Se observó una ligera tendencia ($p=0.09$) de incremento en los niveles de plomo en el suelo de los sitios industriales (Figura 12).

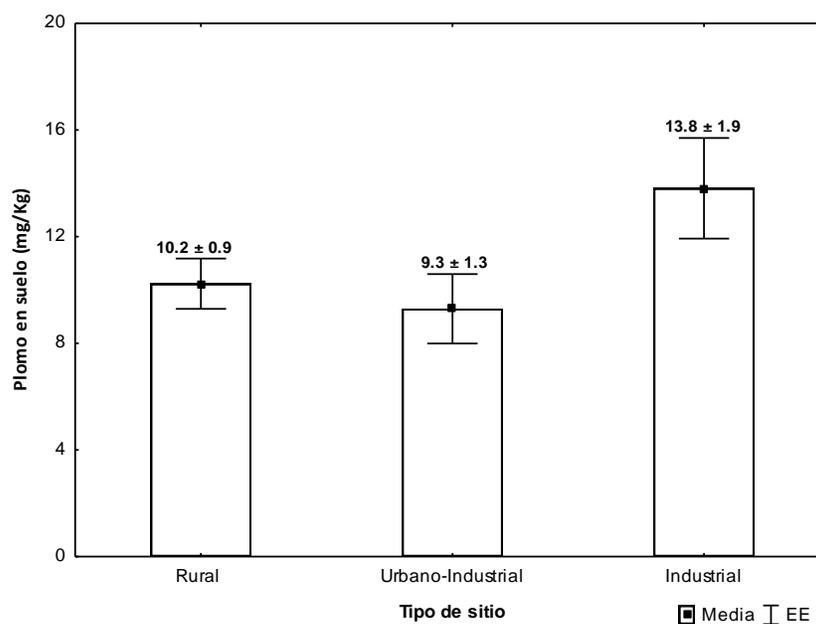


Figura 12. Niveles de plomo en suelo en diferentes sitios de Coatzacoalcos, Veracruz.

Los niveles de plomo en suelo para el primer y tercer muestreo fueron muy similares y también fueron bajos en relación a los valores de referencia de la normativa mexicana e internacional (NOM-147 y CEQG).

Los resultados encontrados son inconsistentes con lo reportado para la región. Diversos autores (Rosales-Hoz y Carranza-Edwards 2005; Rosales-Hoz et al. 2003; Ruelas-Inzunza et al. 2007) concluyen que la intensa industrialización del Río Coatzacoalcos está asociada con el incremento de las concentraciones de metales en muestras ambientales (comparado con muestras provenientes río arriba de la zona industrializada).

El registro de Emisiones y Transferencia de Contaminantes (RETC) publicado por la SEMARNAT (2004), reporta 19.7 ton/año de metales pesados liberados al ambiente por las industrias del ramo petroquímico y químico localizadas en los municipios de Coatzacoalcos y Minatitlán (Figura 4). Como se mencionó anteriormente, hasta el año 1997 operó la empresa Tetraetilo de México (TEMSA) única en el país en la producción de Tetraetilo de plomo (utilizado como aditivo antidetonante para las gasolinas) y que pudo haber sido una fuente industrial importante para la región (Flores and Albert 2004).

De acuerdo con los antecedentes previamente presentados para la zona, se esperaría que existieran niveles más elevados de metales pesados debido a que aún existen fuentes importantes de emisión de metales en las áreas industrializadas de la región, aunado a los residuos provenientes de las actividades industriales históricas realizadas en la zona. Una posible explicación a los niveles tan bajos de metales podría ser el complejo dinamismo hidrológico del estuario que permite la depuración de estos contaminantes.

Compuestos Orgánicos Persistentes

Los COP's detectados en las muestras de suelo para el primer y segundo muestreo se presentan en el Cuadro 7. El patrón de concentración por familias de compuestos en las muestra fue: Σ PCB > Σ HCH > HCB > Σ DDT > Mirex (Figura 13).

Cuadro 7. Concentraciones de COP's en suelo (ng/g) para el 1er y 2do muestreos realizados en Coatzacoalcos, Veracruz.

Sitio	HCB		α -HCH		β -HCH		Lindano		DDT		DDE		Mirex		Σ PCB's	
	1er	2do	1er	2do	1er	2do	1er	2do	1er	2do	1er	2do	1er	2do	1er	2do
Isla Copalapa	335.7	---	98.9	---	N.D	---	88.2	---	N.D	---	6.7	---	N.D	---	389.5	---
Intersección	---	225.9	---	255.4	---	24.4	---	73.1	---	N.D	---	3.1	---	N.D	---	78.6
Punta Brava	830.9	---	464.4	---	64.1	---	84.2	---	N.D	---	4.5	---	3.4	---	1261.4	---
Terranova	56.8	---	508.3	---	57.2	---	2.8	---	10.3	---	3.4	---	3.8	---	162.7	---
Puente II	16.0	---	110.3	---	25.2	---	4.1	---	8.0	---	5.0	---	3.4	---	383.8	---
E. del Pantano	---	240.6	---	237.9	---	27.8	---	33.1	---	43.2	---	4.2	---	N.D	---	12702.6
B. Huatzutlán	208.3	---	94.3	---	N.D	---	120.6	---	N.D	---	N.D	---	N.D	---	140.7	---
Mundo Nuevo	---	373.9	---	238.2	---	28.7	---	55.7	---	N.D	---	N.D	---	N.D	---	137.6
⁺ CEQG (ng/g)	50		NR		NR		10		700		NR		NR		500	

N.D. No detectable.
 --- No se obtuvieron muestras.
 + Corresponde a la suma de los congéneres detectados.
 NR: No se tienen niveles de referencia para este compuesto.
 + Canadian Environmental Quality Guidelines (CEQG).

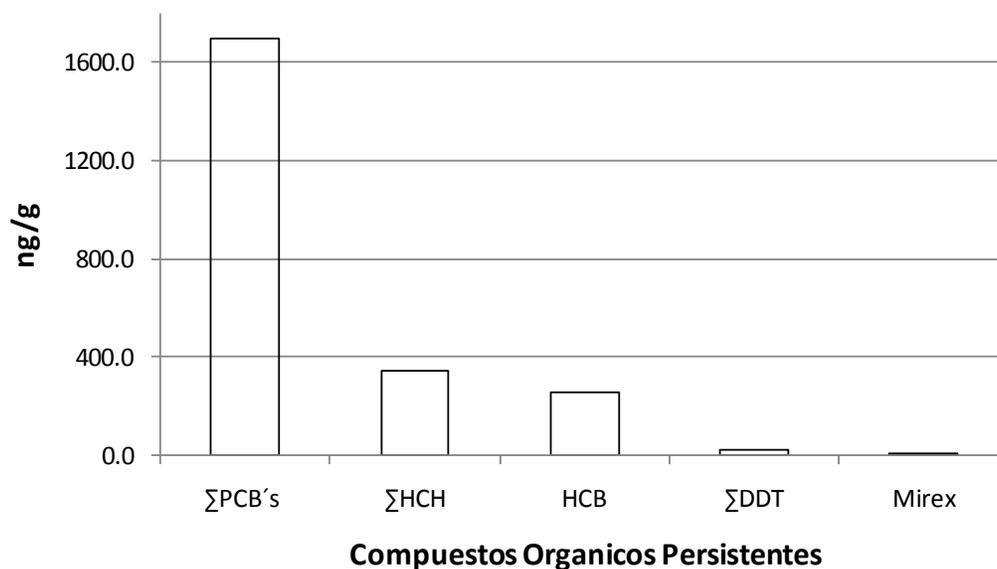


Figura 13. Niveles de Compuestos Orgánicos Persistentes en suelo de Coatzacoalcos, Veracruz.

Los niveles encontrados de Lindano, HCB y PCB's sobrepasan los límites establecidos por la guía canadiense de calidad ambiental (Canadian Environmental Quality Guidelines [CEQG]) y/o por el National Oceanic and Atmospheric Administration (SQuiRT-NOAA), lo que sugiere peligro para los organismos terrestres en la región. Cabe resaltar, que para algunos de estos compuestos orgánicos no se reportan niveles de referencia en suelo.

Los congéneres de PCB's detectados en las muestras de suelo fueron: 52, 70, 74, 82, 87, 90, 101, 105, 110, 118, 128, 132, 138, 149, 151, 153, 156, 158, 170, 180. Algunos de estos congéneres corresponden con los Arocloros de uso más extensivo (ATSDR, 2000). El área de Coatzacoalcos tuvo un fuerte desarrollo industrial desde los 60's por lo que es posible que estos aceites se hayan usado en transformadores y subestaciones eléctricas.

Los niveles de PCB's y HCB en suelo sugieren un patrón en gradiente entre los distintos sitios estudiados, ya que estos tienden a ser más altos en las zonas cercanas a los complejos industriales y a disminuir en zonas alejadas a éstos. Este patrón podría explicarse debido a que estos contaminantes están fuertemente asociados a la actividad industrial y dentro de estas actividades destaca la petroquímica. La presencia de estos contaminantes ha sido observada y reportada en otras partes del mundo donde existe la actividad petroquímica (ATSDRa, 2002, Zitko, 2003b). El HCB también es utilizado como excipiente en la formulación de algunos plaguicidas, por lo que su presencia en la zona podría estar relacionada con la actividad agrícola, principalmente de las aguas arriba del Río Coatzacoalcos.

El DDT fue usado en México con fines de maximizar la producción agrícola y para el control de enfermedades transmitidas por vectores (ATSDRb, 2002). Aunque el DDT fue prohibido a principios de los noventa por sus efectos en el ambiente, aún existe DDT residual en el ambiente debido a las características de persistencia de éste compuesto. La relación DDT/DDE obtenida del promedio de las muestras de suelo es mayor a 1, lo que sugiere que nuevo DDT se está incorporando en el ambiente ya sea por transporte ambiental o por la alteración de reservorios naturales como la re-suspensión de sedimentos.

La presencia de DDT en Coatzacoalcos podría estar relacionada con las campañas de control de vectores realizadas en la zona para el control del paludismo. También es importante considerar el posible uso reciente del plaguicida, el cual puede entrar al país de forma clandestina o en subproductos como el Dicofol.

Las concentraciones de HCH's se presentaron en las siguientes proporciones α -HCH (72%), β -HCH (11%) y γ -HCH (16%), lo que podría corresponder a la formulación de HCH's grado técnico [α -HCH 60-70%, β -HCH 5-12% y γ -HCH de 10-15%] (Willet, 1998; Yim et al. 2005). El HCH grado técnico se utiliza principalmente para el control de ectoparásitos en el ganado bovino, por lo que es probable que las concentraciones registradas en suelo podrían deberse a los aportes de municipios con mayor actividad ganadera ubicados aguas arriba del Río Coatzacoalcos.

Exposición a contaminantes

Compuestos Orgánicos Persistentes

En el monitoreo biológico se detectaron 8 pesticidas organoclorados de los 14 analizados y 13 Bifenilos Policlorados (PCB's) de 21. Todos los organismos capturados presentaron niveles detectables de al menos 3 Compuestos Orgánicos Persistentes (DDE, Lindano y PCB's). En el Cuadro 8 se presentan los niveles de los Compuestos Orgánicos Persistentes detectados en los diferentes tejidos en el sapo gigante para la segunda y tercera fase del muestreo en Coatzacoalcos (se presentan datos concentrados).

De manera general, se encontró el mismo patrón de presencia de contaminantes en tejido adiposo, muscular y hepático en los dos muestreos realizados. La distribución general en los tejidos por familia de compuestos fue $\Sigma\text{DDT} > \Sigma\text{HCH} > \Sigma\text{PCB's}$, HCB y Mirex (Figura 14a). La concentración de Compuestos Organoclorados Totales (COT, Figura 14b) en los tejidos de sapo gigante fueron de 867.2 ng/g en hígado, 404.8 ng/g en musculo y, 322.0 ng/g en cuerpos grasos (estructuras de tejido adiposos).

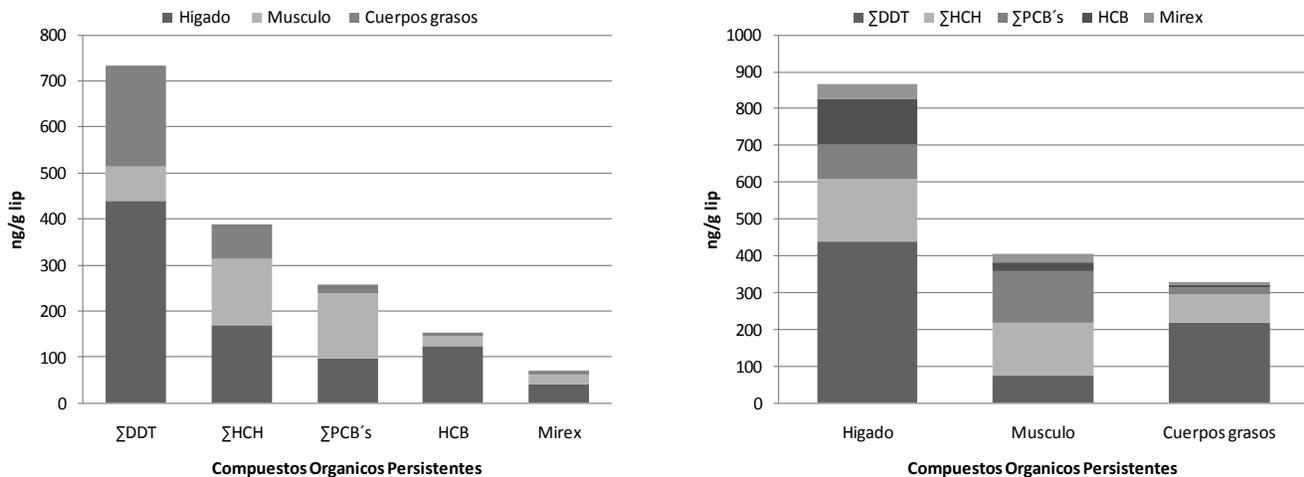


Figura 14. Concentración de compuestos orgánicos persistentes (ng/g lip) en diferentes tejidos de sapo gigante de Coatzacoalcos, Veracruz. a) Ordenado por compuesto y b) ordenado por tejido.

Cuadro 8. Concentración (ng/g de lípidos) de Compuestos Organoclorados en tejidos de sapo gigante colectados en Coatzacoalcos, Veracruz.

	Cuerpos Grasos (n=6^a)	Hígado (n=12*)	Musculo (n=12*)	Plasma (n=12^a)
α-HCH	43.1 (13.5 - 93.4)	47.9 (6.6 - 143.3)	41.7 (9.9 -113.0)	ND
β-HCH	26.4 (10.0 - 51.4)	53.9 (0.3-764.2)	41.9 (0.8-195.5)	ND
γ-HCH	6.1 (3.1 - 14.8)	67.0 (1.8 - 521.8)	59.8 (0.8 - 341.2)	1615.7 (65.8 - 5863.2) 1615.7
p,p'-DDE	190.7 (47.0 - 538.5)	407.1 (13.5 - 3094.5)	72.2 (1.0 - 372.4)	413.9 (25.9 - 3092.3) 413.9
p,p'-DDT	28.7 (10.6 - 77.4)	31.8 (0.3 - 104.4)	1.6 (0.6 - 5.9)	ND
HCB	7.7 (0.5 - 14.1)	123.2 (0.8 -1783.5)	21.9 (0.6 - 196.2)	ND
Mirex	7.4 (3.2 - 15.4)	40.0 (10.6 - 156.5)	23.3 (8 - 36.1)	ND
^aΣPCB's	19.3) (1.5 - 37.0)	95.9 (2.1 - 1015.5)	142.3 (14.0 - 358.2)	953.2 (394.1 - 1912.6) 953.2
^bCOT	329.4 (110.3 - 707.3)	867.2 (89.4 - 5140.0)	404.8 (55.6 - 1214.3)	3528.6 (642.7 - 12471.1) 3528.6

Los datos son reportados como la media, el máximo y el mínimo.
 ND. No detectable.
 *Muestras compuestas (Cada muestra está compuesta de 2 individuos).
^aSumatoria de PCB's correspondiente a 12 congéneres.
^bSuma total de compuestos clorados.

Las concentraciones de COT, Σ DDT, HCB y Mirex tendieron a ser mayores en tejido hepático en comparación con el tejido adiposo (cuerpos grasos) y muscular; los Σ HCH y los Σ PCB fueron mayores en tejido muscular. No se encontraron asociaciones significativas entre las concentraciones de los COP's en suelo y los diferentes tipos de tejido analizado.

La relación DDT/DDE obtenida en los diferentes tejidos de sapo fue menor a 1 (hígado-0.07, musculo-0.02 y cuerpos grasos-0.15) en contraste con lo observado en suelo (relación DDT/DDE >1), lo que podría sugerir la habilidad del organismo para metabolizar el compuesto parental a DDE o una mayor exposición a este metabolito por diferencias en la absorción (derivada del metabolismo microbiano en el intestino). Diversos estudios en anfibios, en especial de la familia de los sapos (Bufonidae) han demostrado la capacidad de estos organismos para acumular concentraciones altas de DDT y sus metabolitos. Cabe mencionar que estos estudios también han mostrado que las proporciones de DDE y DDD fueron en general más altas que las del compuesto parental. En nuestro caso, no se cuantificaron las concentraciones de DDD en los tejidos, por lo que la exposición de los sapos de la región de Coatzacoalcos al DDT y sus metabolitos podría estar siendo subestimada. Las concentraciones de DDE registradas en esta investigación son comparables con las encontradas en anuros adultos procedentes de otros sitios contaminados (en algunos casos son más altas, ver Cuadro 9). Existen registros de concentraciones de Σ DDT y sus metabolitos (predominantemente DDE) de hasta 3480 n/g de grasa en *R. clamitans* proveniente de los humedales del sur de Ontario (Harris et al 1998); en nuestro estudio, detectamos concentraciones de hasta 3094.5 n/g de grasa en muestras de hígado del sapo gigante.

El patrón general de distribución de los Hexaclorociclohexanos (HCH's) observada en los tejidos fue γ -HCH > β -HCH \geq α -HCH a excepción del tejido adiposo, en el cual el patrón se presentó de manera inversa α -HCH > β -HCH > γ -HCH. De acuerdo con la literatura, los patrones de distribución general en mamíferos, aves y peces es β -HCH > α -HCH > γ -HCH; este patrón de distribución está determinado principalmente por la persistencia del compuesto, la ruta de exposición, el metabolismo de la especie y la posición

trófica (Willet et al 1998). Los datos contrastan con el patrón observado en suelo y con otros estudios realizados con organismos de vida silvestre. Algunas posibles explicaciones para interpretar la presencia de una proporción más alta de γ -HCH es la exposición crónica al isómero por diferentes rutas, lo cual podría ser constatado con los valores encontrados en sangre donde el isómero γ -HCH es el único detectable (Cuadro 8). El γ -HCH es más volátil en comparación con los otros isómeros, lo que implica un transporte importante por el aire (Walker et al 1999); el sapo gigante ha sido utilizado como biomonitor de contaminantes atmosféricos debido a su capacidad de respiración pulmonar y cutánea más desarrollada en comparación con otros anfibios.

Dado lo anterior es posible que existan otras rutas de exposición importantes hacia los HCH's además del suelo que aún no han sido exploradas en los sapos y que pueden contribuir de manera significativa a la carga corporal y su distribución en el animal. Aunque las diferencias en las proporciones de los isómeros pueden indicar diferentes fuentes, rutas y tiempos de exposición, y aún no se entiende con claridad para muchas especies la influencia de procesos como la ingesta, la distribución, el metabolismo, y el almacenamiento en las diferencias de la distribución de los isómeros en los tejidos (Willet et al 1998). Las concentraciones HCH's detectadas en este estudio son menores que las observadas en otros estudios realizados en anfibios adultos de vida silvestre residentes en sitios agrícolas (Cuadro 9).

Cuadro 9. Concentración (ng/g de lípidos) de compuestos organoclorados en diferentes especies de anfibios adultos en diferentes estudios*.

	<i>C. arenarum</i>	<i>H. cordobae</i>	<i>L. mystacinus</i>	<i>M. stelzneri</i>	<i>O. Occidentalis</i>	<i>P. tucumanum</i>	<i>R. marina</i> ^a
α -HCH	165.5 (ND-552)	707 (214-1200)	168.6 (54-329.9.)	138.8	458.1 (23.5-892.6)	858.4	39.1 (6.6-143.3)
β -HCH	155.3 (ND-685.2)	898.6 (165-1631)	141.7 (ND-419.2)	ND	308.5 (18.2-598.8)	749.7	3.1 (0.3-14.8)
γ -HCH	186.4 (ND-783.1)	937.9 (267.9-1608)	105.3 (ND-271.2)	93.8	342.9 (26.9-658.9)	799.5	9.0 (1.8-38.7)
DDE	252.4 (ND-1329.9)	166.8 (90.3-243.3)	86.9 (ND-291.3)	209.6	200.7 (14.8-386.4)		307.1 (17.3-1197.4)

Los datos son reportados como la media, máximo y mínimo.
 ND. No detectable.
^a Muestras de hígado, etapa 2 y 3
 *Jofre et al 2008, Venne et al 2008.

Los congéneres de PCB's detectados en las muestras de tejido fueron el 52,101, 105, 118, 138, 153, 156, 170 y 180. Estos congéneres (a excepción del 52) corresponden en su mayor proporción (>30%) al Aroclor 1254^a, una de las mezclas comerciales más vendida en el mundo, lo que sugiere que la procedencia de estos compuestos muy probablemente esté relacionada con el uso de éstos aceites en las áreas industriales de la región.

Los congéneres detectados se caracterizan por ser algunos de los más persistentes en el ambiente y por absorberse en mayor proporción en los organismos. El patrón de presencia de congéneres de PCB's observado en los tejidos del sapo gigante es consistente con otros estudios en anfibios de otras regiones del mundo (Loveridge et al 2007, Russell et al 1997); así como también las concentraciones (Cuadro 10). Cabe mencionar que las concentraciones no están normalizadas por el contenido de lípidos (por motivo de comparación con otros estudios) por lo que los valores podrían ser aún mayores que los presentados.

Cuadro 10. Concentración (ng/g de tejido) de PCB totales en diferentes especies de anfibios adultos en diferentes estudios*.

Sitio	Especie	Tejido	Rango	Referencia
Coatzacoalcos, México	<i>Rhinella marina</i>	Varios	0.39-163.3	Este estudio
Columbia, Canadá	<i>Rana clamitans</i>	Carcasa	2.8	Loveridge et al 2007
Paduca, KY	Varias especies	Carcasa	151-4470	DeGarady y Halbrook 2003
Ontario, Canadá	<i>Rana clamitans</i>	-	7.51	Rusell et al 1997
Ontario, Canadá*	<i>Necturus maculosus</i>	Gonadas y carcasa	113-1082	Bonin et al 1995
Ontario, Canadá*	<i>Rana pipiens</i> <i>Rana clamitans</i>	Carcasa	50-112	Phaneuf et al 1995
Parque nacional en España*	<i>Rana perezi</i>	Musculo	50-1080	Rico et al 1987

* En DeGarady y Halbrook (2003)

El Mirex y el HCB fueron los contaminantes encontrados en menor proporción en los tejidos de sapo. Existen pocos estudios de exposición a Mirex y HCB en anfibios adultos. Russell y colaboradores (2002) reportan concentraciones promedio de 0.26 a 1 ng/g de tejido de HCB en ranas grillo (*Acris crepitans*) procedentes de 5 localidades agrícolas en Ohio EU; en este estudio, los valores de HCB en tejido en sapo gigante varían de 0.04 a 200 ng/g de tejido.

Bioconcentración de COP's

Los factores de bioconcentración calculados para los diferentes tejidos en los sapos gigantes revelan la acumulación principalmente de DDE, DDT y Mirex (Figura 15). Estos compuestos se caracterizan por ser de los más persistentes en el ambiente y los de mayor capacidad de bioacumulación. Los datos se ajustan a lo descrito en la literatura referente a los factores de bioacumulación para estos compuestos (DDE>DDT>Mirex). Cabe mencionar que este factor considera únicamente al suelo como principal ruta de exposición, lo cual podría estar subestimando o sobreestimando los valores reales del factor; es necesario incorporar otras rutas importantes como el alimento para reducir la incertidumbre del factor, ya que es conocido que la exposición a compuestos persistentes en organismos de vida silvestre es principalmente por cadena trófica.

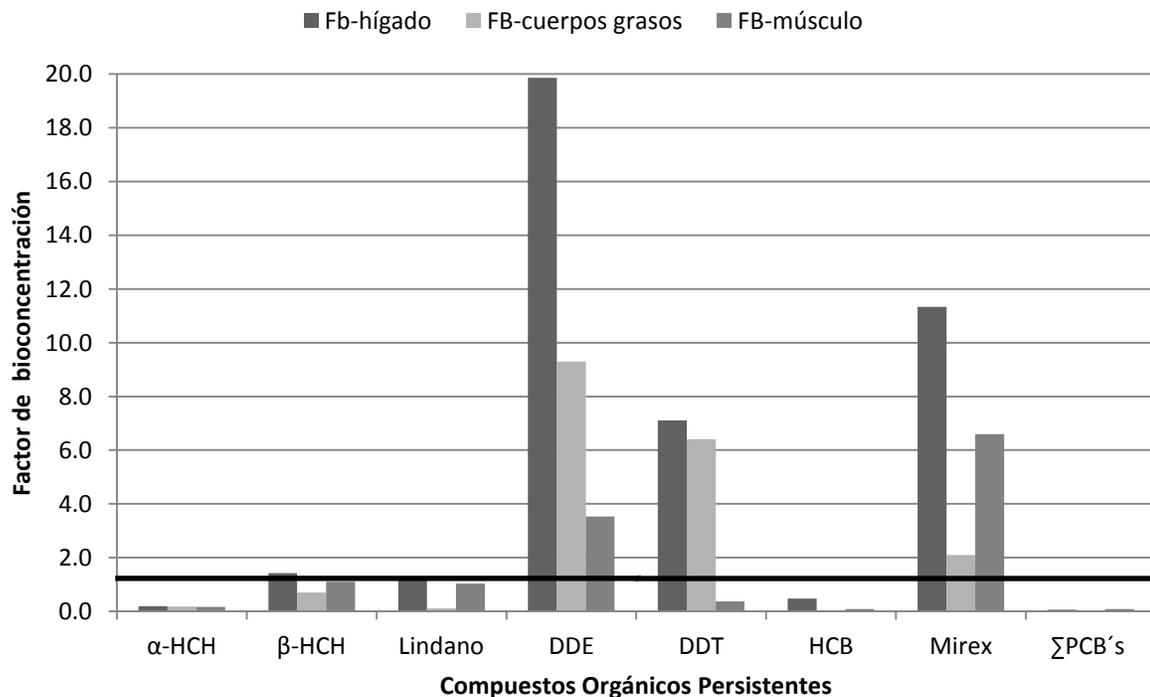


Figura 15. Factores de bioconcentración de Compuestos Orgánicos Persistentes en diferentes tejidos de sapo gigante de Coatzacoalcos, Veracruz. La línea negra representa el equilibrio entre las concentraciones ambientales y las del tejido.

La acumulación de contaminantes en los anfibios está influenciada por muchos factores, puede ocurrir por diferentes vías y en diferentes ambientes de su historia de vida. Como se presentó en el mapa conceptual (Figura 5), los anfibios son el eslabón entre los ecosistemas acuáticos y terrestres; a la vez que se ubican entre los eslabones intermedios de las cadenas tróficas; la presencia de contaminantes altamente persistentes, bioacumulables y biomagnificables, es una situación potencialmente peligrosa que tendría que evaluarse en los depredadores de la región.

Plomo en sangre

Los niveles de plomo en sangre en los sapos variaron entre 10.8 y 70.6 $\mu\text{g/dL}$ (media= 50 $\mu\text{g/dL}$). Se encontró una relación entre los niveles de plomo en la sangre de los sapos y su sitio de colecta (Sitio Rural, Urbano-Industrial e industrial). Los niveles de plomo en sangre de los sapos provenientes de los sitios urbano-industriales e industriales fueron significativamente mayores ($p < 0.01$) que los niveles de los sapos provenientes de los sitios rurales (Figura 16).

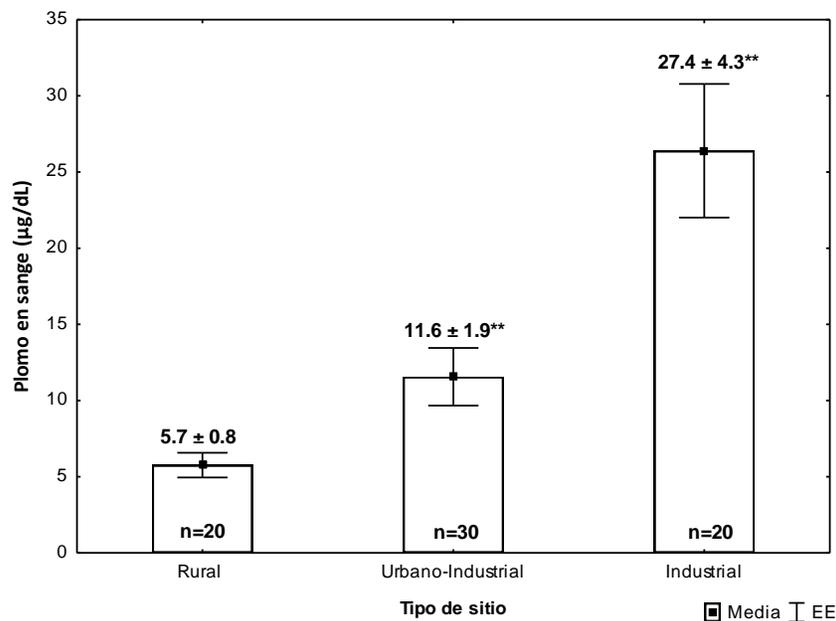


Figura 16. Niveles de plomo en sangre de sapo gigante en diferentes sitios de Coatzacoalcos, Veracruz.
 ** $P < 0.01$ denota diferencias estadísticamente significativas respecto a los sitios rurales.

El incremento en la concentración de plomo en sangre para los sapos de los sitios urbano-industriales e industriales con respecto a los sitios rurales fue de 203.5 y 480.7% respectivamente. Aunque la concentración de plomo en sangre es el índice más comúnmente usado como indicador de exposición, existe poca información de este biomarcador en anfibios adultos y en otros organismos de vida silvestre, por lo que su comparación con otros trabajos resulta difícil. La literatura reporta algunos casos que ilustran la acumulación de plomo en tejidos de anfibios en relación a la intensidad de la contaminación proveniente de fuentes industriales o derivadas de la agricultura. Lindzey et al. (2003) reportaron valores de 3.07-3.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en piel y 0.05- 0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en músculo de sapos gigantes colectados en sitios agrícolas de Bermuda; Arrieta et al. (2001) encontraron un intervalo de concentraciones de plomo en sangre de 1.99 a 4.66 mg/dL en el sapo sudamericano (*Bufo arenarum*) en las proximidades de un área industrial petroquímica en La Plata, Argentina; Lee y Stuebing (1990) demostraron la acumulación de plomo en hígados de sapos (*Bufo yuxztaper*) recolectados en las proximidades de una mina de cobre. Nuestros datos muestran una correlación positiva y estadísticamente significativa ($r=0.82$, $p<0.05$) entre las concentraciones de plomo en suelo y el contenido de plomo en sangre por sitio (Figura 17).

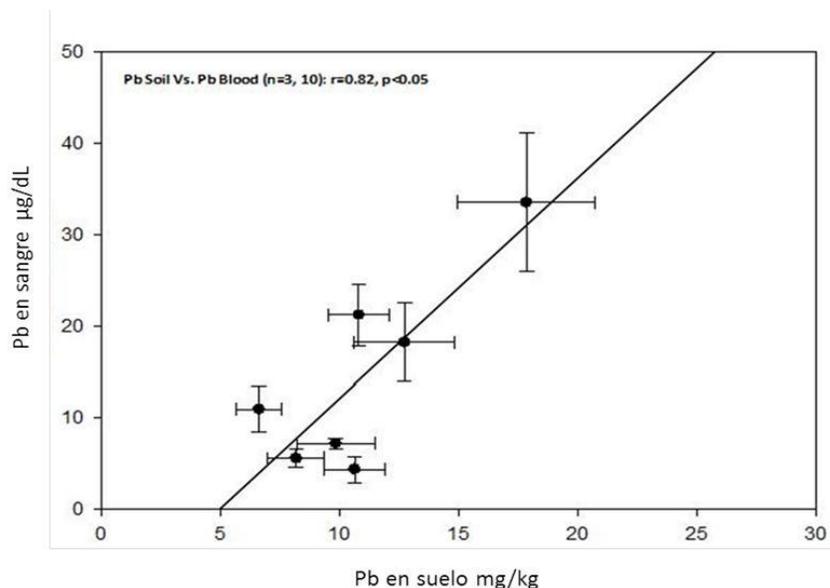


Figura 17. Correlación entre las concentraciones de plomo en suelo y de plomo en sangre de sapos por sitio . Las barras horizontales y verticales indican el error estándar.

Diversos estudios sobre preferencias alimenticias en el sapo gigante han identificado una gran variedad de presas en contenidos estomacales, así como fragmentos de rocas y partículas de suelo (Zug and Zug 1979). Según Gans y Gorniak (1982) en el movimiento de alimentación del sapo gigante (lingual flip), la lengua entra en contacto directo con el suelo, lo que podría explicar la presencia de partículas de suelo en los contenidos estomacales; lo que sugiere que la ingesta accidental de suelo puede ser considerada como una vía importante de exposición al plomo.

De acuerdo con Hoz y Edwards (2005), las fracciones biodisponibles de metales pesados en muestras de sedimento de Coatzacoalcos presentan una alta biodisponibilidad del plomo en comparación con los otros metales evaluados. Sin embargo, las relativamente bajas concentraciones de plomo en suelo en el área de estudio sugieren que podrían existir otras rutas de exposición no evaluadas en este estudio. Al respecto, Beyer and Cromartie (1987) reportaron concentraciones 1.4 a 2100 mg/kg d.w. en lombrices colectadas en diversos sitios contaminados por plomo. De acuerdo con Zug and Zug (1979) la tasa de ingesta promedio de lombrices para los sapos gigantes es de 43.2 presas/día; por lo que la dosis de plomo por ingesta de lombrices puede llegar a ser considerable. En estudios preliminares en la zona, hemos encontrado la presencia de plomo en sedimento (2.8 a 57.8 mg/kg, datos no publicados) y en partículas de polvo (32.0 a 549.0 mg/kg, datos no publicados); esto es particularmente importante ya que los organismos pueden estar expuestos al metal en el sedimento desde las etapas tempranas del desarrollo y posteriormente en etapas adultas por respiración de partículas con plomo.

Respuestas biológicas

Genotoxicidad

Se presentan solo los resultados obtenidos del segundo muestreo (Ver Cuadro 4) debido a que las muestras del tercer muestreo no fueron legibles casi en su totalidad derivado del manejo en campo. Los datos del segundo muestreo sugieren mayor daño al ADN ($p < 0.05$) en los sapos residentes en el sitio industrial en comparación con los sapos del sitio urbano (Figura 19). Los resultados de daño al ADN obtenidos son comparativamente más bajos (de 2 a 12 veces) que los observados en estudios de laboratorio en sapos (*Bufo bufo*) expuestos a herbicidas (Yin et al 2008). Nuestros resultados son consistentes con lo observado en estudios de monitoreo de genotóxicos en zonas agrícolas con anfibios de vida libre (*Rana Clamitans* y *Rana Pipiens*). Estos estudios mostraron diferencias significativas de daño al ADN en los sapos residentes de zonas agrícolas respecto a los sitios de referencia (Dhawan et al 2009). El biomarcador indica la presencia de agentes genotóxicos y generadores de radicales libres en el sitio; por lo que una evaluación a detalle del sitio es necesaria, principalmente por la presencia de hidrocarburos.

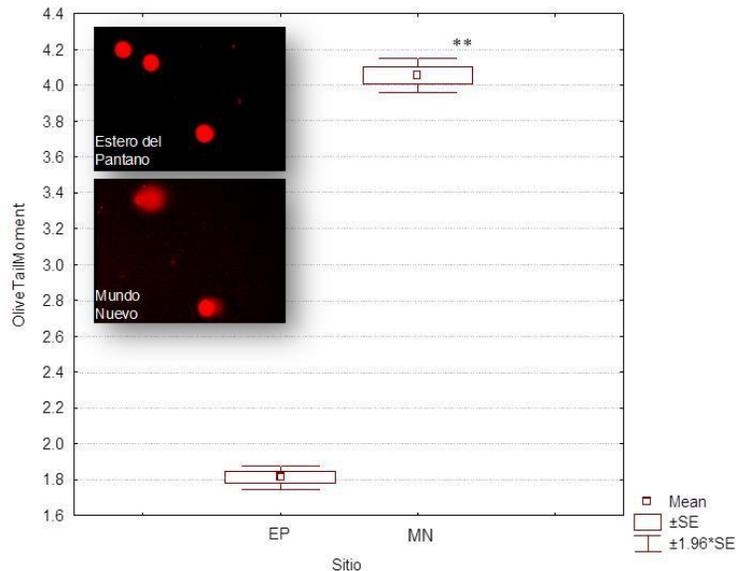


Figura 18. Daño al ADN en células de sangre de sapo gigante en diferentes sitios de Coatzacoalcos, Veracruz. EP-Estero del Pantano, MN-Mundo Nuevo. *** $P < 0.01$ denota diferencias estadísticamente significativas respecto al sitio urbano industrial.

Actividad de la δ -ALAD

Las concentraciones de δ -ALAD en sangre en los sapos gigantes se encuentran entre 9.1 y 262.8 (media= 112.7 ± 8.2) $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{L}$ de eritrocitos. En la Figura 19 se muestra una disminución significativa de la actividad δ -ALAD en los sapos provenientes de los sitios urbano-industriales e industriales, comparando con los sapos de las zonas rurales ($p < 0.01$).

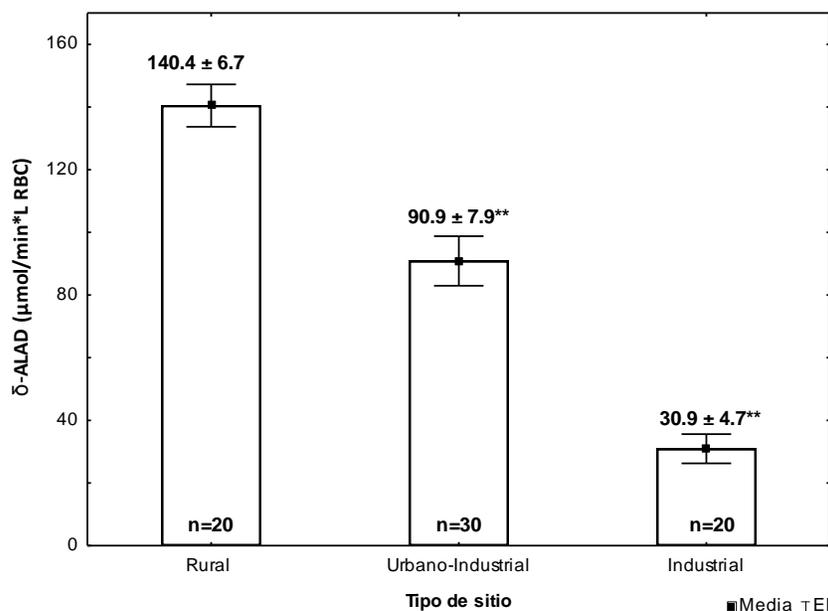


Figura 19. Actividad de la δ -ALAD en sangre de sapo gigante en diferentes sitios de Coatzacoalcos, Veracruz. ** $P < 0.01$ denota diferencias estadísticamente significativas respecto a los sitios rurales.

El decremento en la actividad δ -ALAD en sangre fue de 35.3 al 78.0% para los sitios urbano-industriales e industriales, respectivamente. Nuestros resultados reflejan una relación negativa significativa ($r = -0.84$, $p < 0.01$) entre la actividad de la δ -ALAD y la concentración de plomo en sangre (Figura 20). La línea de regresión que correlaciona al logaritmo de plomo en sangre con la actividad de la enzima δ -ALAD fue: $y = 2.11 + \log 0.60x$.

El patrón de inhibición enzimática observado en los resultados concuerda con lo registrado en anfibios adultos expuestos a plomo de manera experimental (Perí et al. 1998a; Arrieta et al. 2000). Estos trabajos han encontrado inhibiciones de la actividad de la δ -ALAD del 27 al 90% con respecto a los controles, mostrando un claro patrón concentración-efecto.

Los estudios previos y los resultados del presente estudio, demuestran que la inhibición de la δ -ALAD puede considerarse como un biomarcador de exposición al plomo en anfibios adultos aplicable tanto en condiciones de laboratorio como de campo.

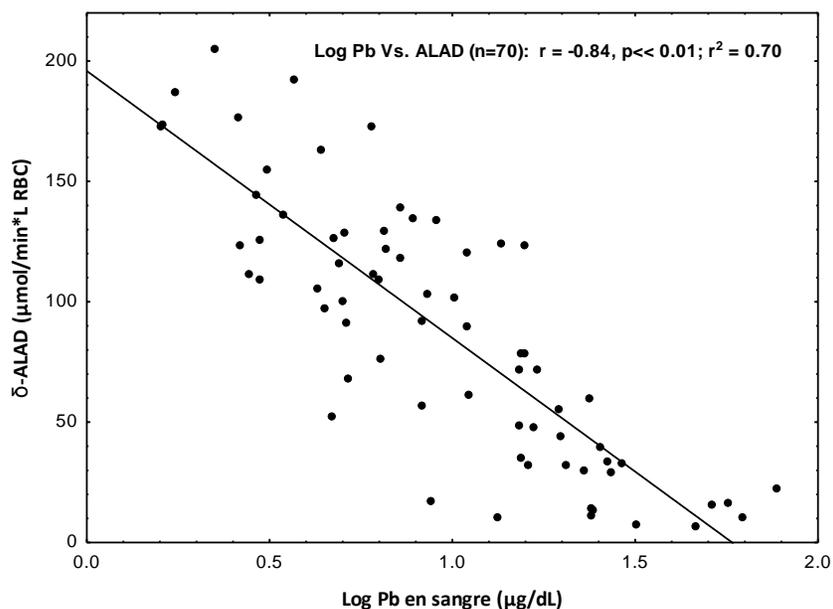


Figura 20. Relación entre las concentraciones de plomo en sangre y la actividad de la δ -ALAD de sapo gigante de Coatzacoalcos, Veracruz.

Los niveles de plomo en sangre que causan una inhibición significativa en la actividad de la δ -ALAD en los estudios realizados por Arrieta et al (2000; 2004) y Peri et al (1998a) en *Bufo arenarum* son mayores en comparación con los niveles determinados en nuestro trabajo ($IC_{50} = 16 \mu\text{g/dl}$); lo que sugiere que el sapo gigante *Rhinella marina* podría ser un mejor bioindicador en la inhibición enzimática a bajas concentraciones de plomo.

Alteraciones hematológicas

El contenido promedio de hemoglobina y de los valores de hematocrito en sangre en los sapos gigantes de Coatzacoalcos fueron de 8.2 ± 0.2 (De 4.1 a 11.6) mg/dL y 34 ± 0.9 (De 16 a 49) % respectivamente.

No existen valores de referencia sobre intervalos "normales" de los parámetros hematológicos en el sapo gigante; sin embargo, Hall (1966) describió por primera vez el funcionamiento de la hemoglobina para esta especie y reportó algunos parámetros hematológicos que se usaron como referencia en éste estudio. De acuerdo con ésta información, el 52.9% de los sapos provenientes de la región de Coatzacoalcos presentó valores de hemoglobina por debajo de los considerados como óptimos y el 27.1% presenta valores anormales de hematocrito (Cuadro 11).

Cuadro 11. Porcentaje de sapos gigantes por intervalos de referencia para parámetros hematológicos.

Parámetros hematológicos	Límite inferior (LI)	Rango optimo (RO)	Límite superior (LS)
Hematocrito (%) ^a	22.9	72.9	4.2
Hemoglobina (mg/dL) ^b	52.9	47.1	0
^a Hct (LI <28.9, RO 28.9-45.7, LS > 45.7).			
^b Hb (LI<8.5, RO 8,5-13.7, LS >13.7).			
^{a,b} basado en Hall (1966).			

Nuestros datos muestran que las concentraciones de hemoglobina y los valores de hemoglobina corpuscular media de los sapos provenientes de los sitios rurales fueron significativamente mayores que los de los sapos provenientes de los sitios urbano-industriales e industriales (Figura 21 y Figura 22). El decremento en la concentración de la hemoglobina en sangre y de la hemoglobina corpuscular media para los sapos de los sitios urbano-industriales e industriales fue de 11.1 al 17.8%; y de 9.8 al 10.2%, respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticas en los niveles de hematocrito en sangre (Figura 23).

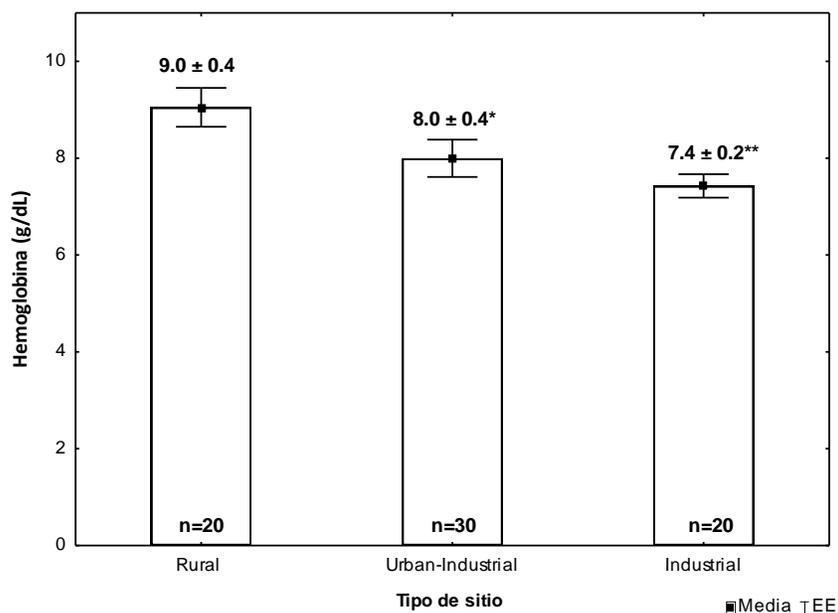


Figura 21. Contenido de hemoglobina en sangre de sapo gigante en diferentes sitios de Coatzacoalcos, Veracruz. *P<0.05, **P<0.01 denota diferencias estadísticamente significativas respecto a los sitios rurales.

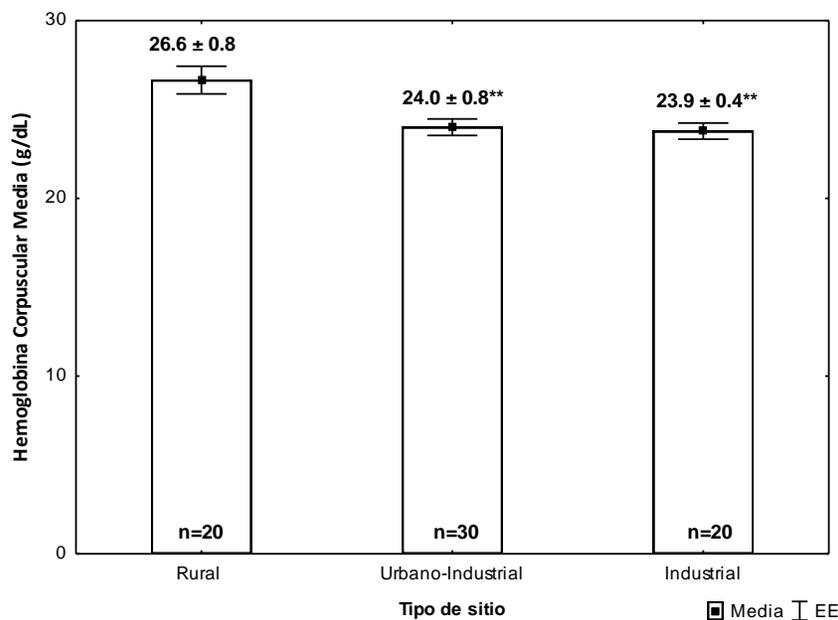


Figura 22. Contenido de hemoglobina corpuscular media en sangre de sapo gigante en diferentes sitios de Coatzacoalcos, Veracruz. **P<0.01 denota diferencias estadísticamente significativas respecto a los sitios rurales.

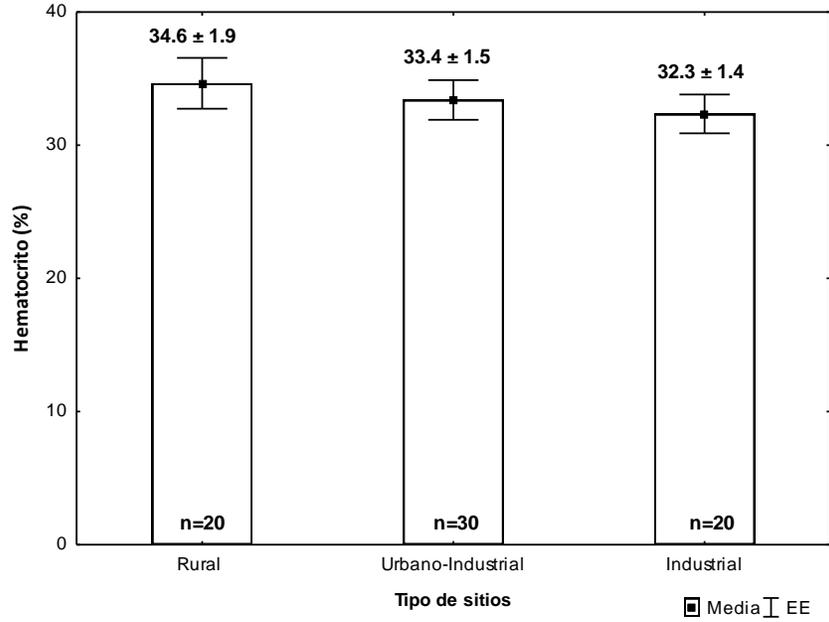


Figura 23. Valores de Hematocrito en sangre de sapo gigante en diferentes sitios de Coatzacoalcos, Veracruz.

Los resultados presentaron una asociación negativa significativa ($r = -0.41$, $p < 0.01$, $n = 70$) entre los niveles de plomo en sangre y la hemoglobina corpuscular media (Figura 24).

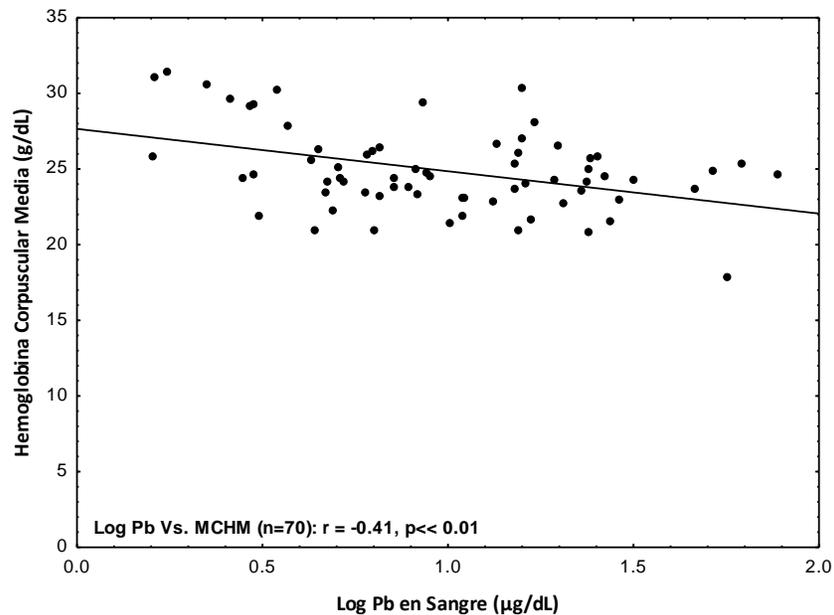


Figura 24. Relación entre las concentraciones de plomo en sangre y la hemoglobina corpuscular media en sapo gigante de Coatzacoalcos, Veracruz.

Los resultados pueden interpretarse como una anemia secundaria derivada de la inhibición de la actividad enzimática δ -ALAD y por consiguiente en la síntesis de la hemoglobina por exposición al plomo en los sapos con altos niveles de plomo en los sitios con influencia industrial. Es conocido que la exposición a plomo en anfibios causa anemia y condiciones hypóxicas debido al decremento en los niveles de hemoglobina (Rice et al. 1999). Las respuestas fisiológicas que llevan a la hipoxia en vertebrados están ampliamente documentadas y generalmente se centran en dos mecanismos adaptativos: el incremento en el volumen de ventilación y el aumento en la capacidad de acarreamiento de oxígeno (O_2) de la sangre (Brauner and Wang 1997). Durante la hipoxia, muchos vertebrados, incluyendo los anfibios, aumentan la capacidad de transporte de O_2 incrementando el número de glóbulos rojos en la sangre (fenómeno conocido como policitemia); el grado de policitemia y su duración dependen de las condiciones ambientales, mientras que se han reportado casos donde este mecanismo se ha presentado sin cambios significativos en el hematocrito (Brauner and Wang 1997). Los resultados muestran una asociación positiva ($r=0.31$, $p<<0.01$) entre los niveles de plomo en sangre (transformación log) y el hematocrito (Figura 25).

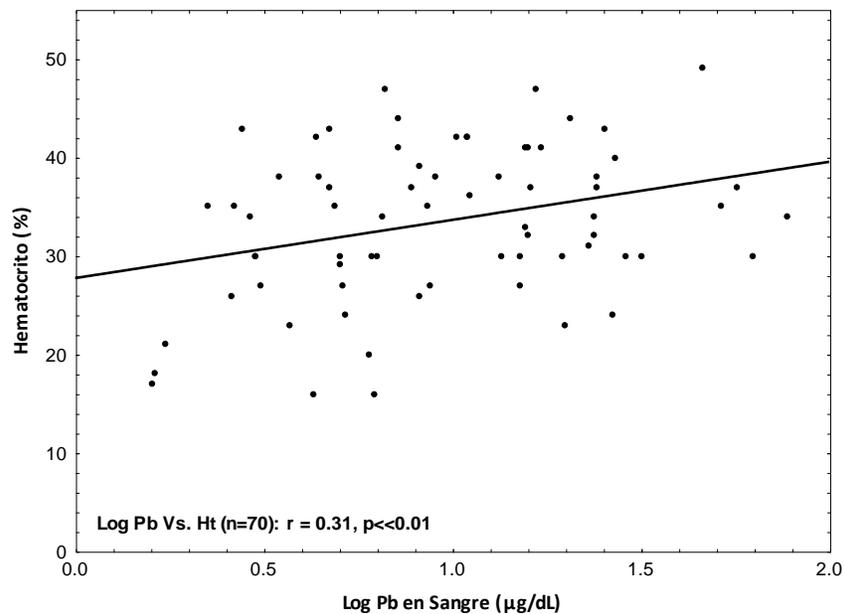


Figura 25. Relación entre las concentraciones de plomo en sangre y el hematocrito en sapo gigante de Coatzacoalcos, Veracruz.

El patrón de incremento en el hematocrito y otros parámetros hematológicos han sido registrados en estudios experimentales en sapos gigantes con anemia y expuestos a diferentes grados de hipoxia (Wood 1990; Pörtner et al. 1991; Wood and Malvin 1991; Andersen et al. 2003). Consideramos que el incremento del hematocrito en función de los niveles de plomo en sangre puede interpretarse como un mecanismo de compensación a las condiciones hipóxicas ocasionadas por la anemia.

Factor de condición

El factor de condición de Fulton registrado para los sapos de Coatzacoalcos fue de 105.6 ± 2.5 (De 68.0 a 149.8). Se encontró una disminución del 11.4% en el factor de condición en los sapos provenientes de los sitios industriales con respecto a los sapos provenientes de los sitios rurales ($p < 0.05$, Figura 26).

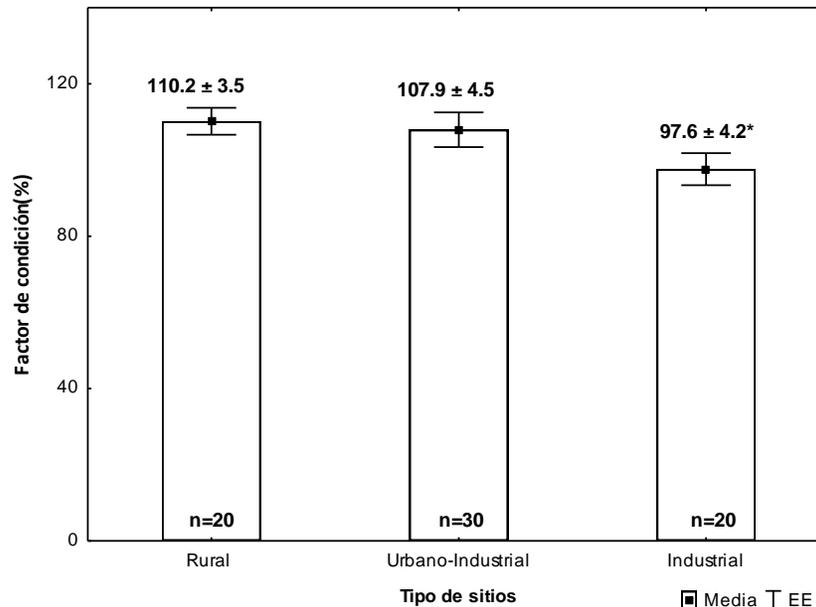


Figura 26. Factor de condición de sapos gigantes en diferentes sitios de Coatzacoalcos, Veracruz.

La disminución en el factor de condición es interpretada generalmente como un decremento en la energía de reserva almacenada en la grasa y en el hígado con posibles implicaciones negativas para el crecimiento, sobrevivencia y reproducción de los organismos (Nash, 2006; Stevenson and Woods 2006). Diversos estudios en invertebrados acuáticos, peces y aves demuestran un decremento significativo en el factor de condición en organismos expuestos a contaminantes ambientales (Goede y Barton; 1990, Lieven y Ronny, 2003).

La disminución en los índices de condición en los sapos provenientes de los sitios industriales puede deberse a que algunos contaminantes presentes en esos sitios pueden generar alteraciones en la tasa de ingesta y en la tasa metabólica, así como en la absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal. Existen pocos estudios sobre los efectos de los contaminantes en la nutrición y el metabolismo en anfibios; sin embargo se ha reportado que el plomo y el DDT pueden causar cambios en el tracto digestivo y por consiguiente alterar la absorción de nutrientes, así como aumentar la demanda de oxígeno debido a los costos energéticos de reparación de los daños (Rice et al. 1999).

Durante las condiciones de hipoxia, los organismos ectotermos responden al estrés con una disminución en la temperatura de preferencia (PT), seguido de una reducción en la temperatura corporal (Tb, considerada por algunos autores como hipotermia) para la reducción del consumo de O₂. La hipotermia como respuesta conductual a la hipoxia y la anemia han sido ampliamente documentadas en sapos gigantes (Pörtner et al. 1991; Wood and Malvin 1991; Wood 1991). Wood (1990, 1991) encontró una relación directa entre los niveles de hematocrito y la selección de la PT, por lo que la anemia podría inducir hipotermia en estos organismos.

El efecto más significativo de la hipotermia es el decremento en la tasa metabólica, lo que podría tener efectos directos en la alimentación debido a la reducción de la tasa de ingesta, un aumento en el estrés fisiológico (producción de catecolaminas y lactato) y alteraciones en el comportamiento locomotor (escape y búsqueda de alimento) comprometiendo finalmente la sobrevivencia del organismo (Feder and

Burggren 1992; Wood and Gonzales 1996; Chapman and McKenzie 2009). Cabe mencionar que la menor disponibilidad de alimento también puede ser un factor que influya de manera determinante en los sitios con mayor impacto antropogénico, sin embargo este escenario no ha sido investigado.

Posibles efectos

En función de los datos disponibles, las distribuciones de especies sensibles (SSD) fueron calculadas para el Lindano, DDT, PCB's y Mirex. Todos los modelos SSD fueron calculados a partir de datos de concentraciones letales en tejido (concentración interna letal al 50%) CIL_{50} . Se probaron 5 diferentes modelos para el cálculo de HC_5 (ejemplo del Mirex en la Figura 27). Las HC_5 calculadas para los compuestos y los modelos seleccionados se presentan en el Cuadro 12.

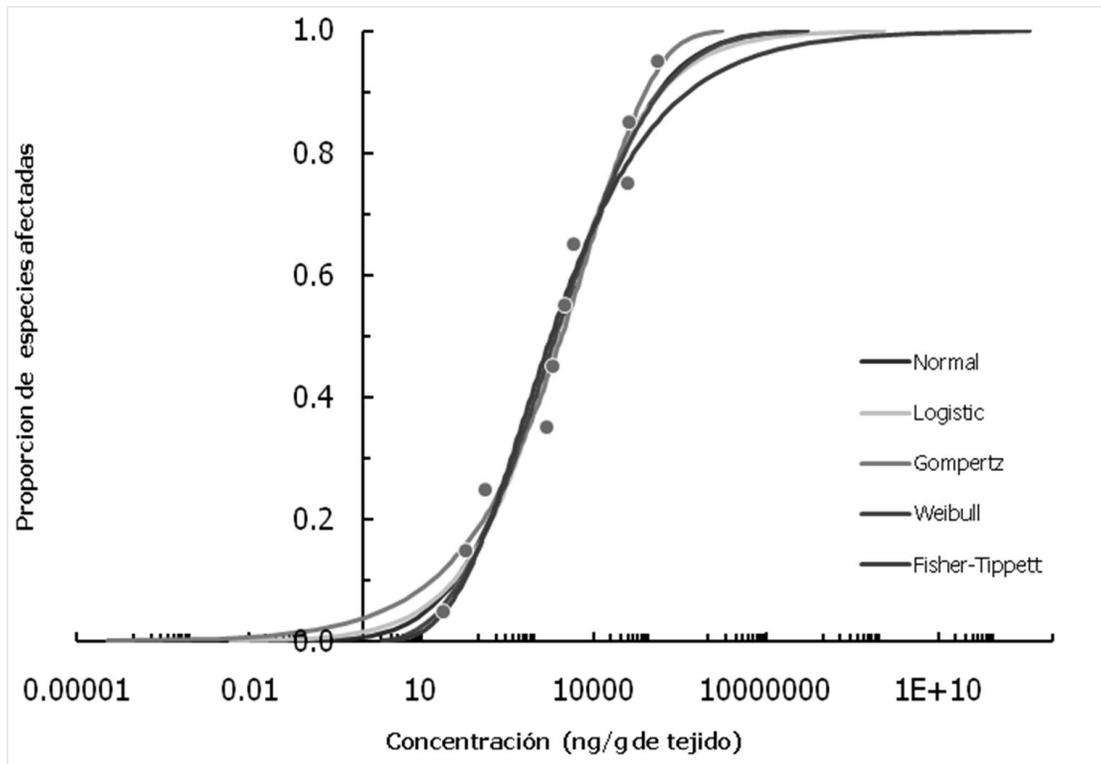


Figura 27. Modelo de distribución de la sensibilidad de las especies a Mirex para efectos de letalidad.

Cuadro 12. Análisis determinístico de la peligrosidad hacia la exposición a Compuestos Orgánicos Persistentes en sapo gigante para efectos de letalidad.

Parámetro	γ -HCH (n=12)	Σ PCB (n=12)	DDT (n=10)	Mirex (n=10)
HC ₅	2.98	1608.2	1.78	2.0
Modelo	Gompertz	Gompertz	Gompertz	Gompertz
CP _{HC5/med}	1.399	0.009	5.853	1.455
CP _{HC5/max}	19.734	0.101	39.393	6.624
HC ₅ = Concentración peligrosa al 5% CP=Cociente de peligrosidad med- Concentración media max- Concentración máxima				

Los datos del cociente de peligrosidad indican riesgo de letalidad en el siguiente orden: DDT>Lindano>Mirex. Los PCB's presentaron el menor riesgo o niveles seguros para los sapos gigantes. Los cocientes de peligrosidad para Lindano y DDT se mostraron ser de 20 a 40 veces mayores en comparación a los niveles de referencia usando las concentraciones máximas en tejido obtenidas en el estudio. Dada la variabilidad de los valores en las determinaciones de contaminantes en tejido y para reducir la incertidumbre se realizó una modelación probabilística para los compuestos que presentaron riesgo (Cuadro 13).

Cuadro 13. Análisis probabilístico de la peligrosidad hacia la exposición a Compuestos Orgánicos Persistentes en sapo gigante para efectos de letalidad.

PARAMETRO	γ -HCH (n=12)	DDT (n=10)	Mirex (n=10)
HC ₅	2.98	1.78	2.0
*Distribución HC ₅	Triangular	Triangular	Triangular
Distribución COP'S _{tej}	Log-normal	Gamma	Log-normal
(%)>1	18.9	28.9	29.7
HC ₅ =Concentración peligrosa al 5%. CP =Cociente de peligrosidad. *Distribución estimada con la media± 95% de confianza de la media.			

La modelación probabilística indica riesgo de letalidad por lo que es consistente con el patrón de riesgo observado en la modelación determinística (Cuadro 12). El Mirex y el DDT presentan el mayor riesgo (29 y 30% respectivamente), seguido del lindano (19%). Es probable que estas concentraciones causen letalidad principalmente en etapas tempranas del desarrollo de los sapos; al respecto Rowe et al (2001) encontró alteraciones en el reclutamiento de individuos jóvenes en la población de *Bufo terrestris* derivada de exposición a contaminantes.

En cuanto a los posibles efectos por exposición al plomo; los cocientes de peligrosidad calculados para los anfibios de Coatzacoalcos revelaron valores de hasta 3.9 veces mayores en relación con los valores tóxicos de referencia para mamíferos. El análisis probabilístico mostró un patrón de incremento en el riesgo en función del tipo de sitio y el impacto antropogénico (Cuadro 14); de manera tal que el mayor riesgo encontrado fue para los sapos residentes en los sitios industriales, lo cual concuerda con los datos de alteraciones hematológicas y de inhibición enzimática encontrados en este estudio.

Cuadro 14. Análisis probabilístico de la peligrosidad hacia la exposición a plomo en sapo gigante para efectos reproductivos y hematológicos.

PARAMETRO	Rural	Urbano-Industrial	Industrial	Total
*Distribución	Log-normal	Log-normal	Log-normal	Log-normal
(%)>1	0.36	18.0	61.6	24.1
*Distribución ajustada				

Los modelos de simulación probabilística sugieren que las poblaciones de sapos gigantes residentes en los sitios industriales son susceptibles a presentar efectos reproductivos y hematológicos derivados de la exposición a plomo. Cabe mencionar que, debido a la falta de especificidad en los valores de referencia, podría haber una sobreestimación o subestimación de los riesgos.

Conclusiones y recomendaciones

"We wish truth, and we find only uncertainty"

Blaise Pascal

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran la presencia de contaminantes orgánicos persistentes y de metales en suelo. Aunado a esto, se detectó la presencia de estos compuestos contaminantes en los tejidos de los sapos gigantes residentes en el sitio. También, se registraron efectos biológicos subletales relacionados directamente con la exposición a estos contaminantes. La integración e interpretación de las líneas de evidencia así como de sus incertidumbres (Cuadro 15) muestran un riesgo alto para las poblaciones de sapos gigantes y otras especies del humedal, principalmente de aquellas que residen cerca de los complejos industriales por lo que la intervención de estos sitios es necesaria.

Las concentraciones detectadas de Lindano, HCB y PCB's en suelo de los sitios analizados fueron superiores a las guías internacionales, lo que implica un posible riesgo a la salud de los diferentes componentes biológicos del humedal.

Aunque los niveles de plomo en suelo y sedimento no sobrepasan los límites establecidos por la normativa mexicana y guías internacionales, las concentraciones encontradas en el ambiente en este estudio representan una alta exposición y marcados efectos subletales para las poblaciones de sapos gigantes residentes en la región.

Las concentraciones cuantificadas en suelo para contaminantes como α -HCH, β -HCH, Lindano, DDE y DDT, no permiten establecer un gradiente de concentración claro a partir de una fuente probada. De manera tal que el área de Coatzacoalcos estudiada puede considerarse como una zona generalizada de exposición a estos contaminantes. Para el caso de los Bifenilos Policlorados, Hexaclorobenceno y el Plomo, es posible observar un gradiente de distribución espacial en suelo entre los distintos sitios; ya que los niveles de estos contaminantes tienden a ser más altos en las zonas cercanas a los complejos industriales y a disminuir en zonas alejadas a éstos. Aunque este patrón podría explicarse debido a que estos contaminantes están fuertemente asociados a la actividad industrial se requieren de monitoreos ambientales sistemáticos en tiempo y espacio para demostrar esta hipótesis.

Los resultados registrados en el estudio muestran de manera clara la existencia de exposición a HCH`s, DDT`s, HCB, Mirex, PCB`s y Plomo en sapos gigantes de la región de Coatzacoalcos; a su vez que destaca la alta bioconcentración de los compuestos más persistentes.

La evaluación de la exposición en los tejidos de sapo gigante mostró un buen reflejo de los contaminantes encontrados en el ambiente (principalmente Plomo, DDT y DDE) en la zona. Las características fisiológicas, ecológicas, y ecotoxicológicas, del sapo gigante además de su amplia distribución, fácil captura y manejo, lo convierten en un organismo recomendable para ser utilizado en programas de monitoreo ambiental para la región de Coatzacoalcos y otras regiones tropicales de México y Sudamérica.

Se sugiere establecer una batería de biomarcadores más amplia y específica, con la finalidad de recabar líneas de evidencia más sólidas que permitan establecer el nivel de afectación en los sapos derivada de la exposición a Compuestos Orgánicos Persistentes.

Nuestros resultados muestran que las concentraciones de plomo en sangre, la actividad de la enzima δ -ALAD y los parámetros hematológicos en el sapo gigante (*Rhinella marina*) pueden ser utilizados como biomarcadores

sensitivos y confiables en condiciones de campo para evaluar los efectos de la exposición a Plomo.

Existe una alta incertidumbre sobre la causa de los efectos en la condición en los sapos gigantes; es factible que exista exposición a otros agentes estresantes en la zona, que no se han evaluado en el presente estudio (ej. HAPs, HTPs, COV's, dioxinas y el Monómero de Cloruro de Vinilo de los cuales se sabe que existen en la zona) que podrían estar relacionados con los efectos observados.

Los modelos de extrapolación de efectos indican la probabilidad de efectos letales, hematológicos y reproductivos en sapo gigante. Es importante considerar las implicaciones de estos resultados en otros anfibios del humedal; aunque la incertidumbre de estos modelos es alta se requiere de otros estudios para verificar y complementar los modelos.

La aplicación de esta metodología en otros sitios contaminados en diferentes contextos es factible; durante la realización del presente trabajo se detectaron algunas limitantes que complicaron su aplicación adecuada como la capacidad analítica, problemas técnicos, la falta de recursos y de equipamiento en el sitio de estudio.

Este estudio ofrece una línea base sobre el estado de la contaminación por metales pesados y compuestos orgánicos persistentes en la región industrial de Coatzacoalcos y de efectos subletales de en las poblaciones silvestres de sapo gigante. Consideramos que se requieren más estudios en las poblaciones de anfibios y otros organismos silvestres en Coatzacoalcos y en particular, sobre el establecimiento de los niveles tóxicos de referencia (TRVs), la identificación de las posibles rutas de exposición a otros contaminantes en los sistemas acuáticos y terrestres, la evaluación de diversos efectos de relevancia ecológica (ej. genotóxicos, neurotóxicos y endocrinos), con la finalidad de identificar y cuantificar con menor incertidumbre los riesgos asociados en las poblaciones de anfibios de la región, así como sus implicaciones en la salud humana y de los ecosistemas.

Cuadro 15. Análisis de líneas de evidencia de riesgo para Coatzacoalcos Veracruz.

	Línea de evidencia	Fuerza	Consistencia	Gradiente	Plausibilidad	Especificidad	Analogía
Contaminación ambiental	Metales y metaloides	(-) Las concentraciones de metales pesados en suelo no sobrepasaron las guías de referencia.	(±) Se identificó el mismo patrón de presencia de contaminantes pero las concentraciones no son comparables.	(±) Tendencia de incremento en la concentración de plomo en suelo en relación a los sitios industriales. (-) Datos insuficientes.	No aplica.	No aplica.	(-) La información no corresponde con los valores esperados y/o reportados en otros estudios.
	Compuestos orgánicos Persistentes	(+) Las concentraciones de Lindano, HCB y PCB's en suelo sobrepasaron desde 3 hasta 25 veces los umbrales.	(+) De la evaluación ambiental en la región el 50% de las muestras sobrepasaron los umbrales. (+) Se identificó el mismo patrón de presencia de compuestos en los muestreos realizados	(+) Gradiente claro para HCB en función de la actividad industrial. (±) Datos similares de DDT y DDE en el área. (-) Inconsistencia en los niveles de PCB's. (-) HCH's sin patrón aparente de distribución. (-) Datos insuficientes.	No aplica.	No aplica.	(-) Información no disponible o comparable para algunos compuestos. (+) Niveles de DDT similares a estudios previos realizados en la zona.
Exposición a contaminantes	Metales Pesados	(+) Concentraciones de plomo en sangre mayores a niveles de referencia.	(+) Se han identificado niveles de plomo en tejido en especies acuáticas de la región.	(+) Gradiente de exposición en función de la cercanía de los sitios industriales. (+) Relación entre las concentraciones de Pb en suelo y Pb en sangre.	(+) Bastas referencias sobre la bioacumulación de plomo en sitios contaminados en anfibios y reptiles y otros grupos taxonómicos.	No aplica.	(+) Gradiente de exposición en función de la cercanía de los sitios industriales en peces y bivalvos de la región.
	Compuestos Orgánicos Persistentes	(-) No existen umbrales de referencia para estos compuestos en anfibios.	(+) Se encontró el mismo patrón de presencia de contaminantes en relación a las muestras ambientales. (+) Mismo patrón en muestras biológicas en otros receptores.	(-) No es posible generalizar patrones de distribución por la variabilidad de los datos.	(+) Existen referencias sobre la utilidad de anfibios como acumuladores de COP's.	No aplica.	(+) Bioacumulación importante de DDE y PCB's comparables a otros sitios contaminados. (-) Información insuficiente para comparación.

Línea de evidencia		Fuerza	Consistencia	Gradiente	Plausibilidad	Especificidad	Analogía
Respuestas biológicas	Genotoxicidad	(+) Se presentó más del 20% del efecto en los sitios industriales.	(-) No existen otros estudios en la región.	(+) Gradiente claro de inhibición en relación a la actividad industrial.	(+) Mecanismo descrito en anfibios y otras especies de vertebrados.	(-) Respuesta no específica.	(+) Respuesta análoga en estudios in vitro y de campo.
	Inhibición ALAD	(+) Se presentó más del 20% del efecto en los sitios industriales y urbano-industriales.	(-) No existen otros estudios en la región.	(+) Gradiente claro de inhibición en relación a la actividad industrial.	(+) Mecanismo descrito en anfibios y otras especies de vertebrados.	(+) Inhibición específica por plomo. (+) Relación entre concentración de plomo en sangre e inhibición ALAD.	(+) Respuesta análoga en estudios in vitro y de campo en vertebrados expuestos al plomo.
	Alteraciones hematológicas	(+) Se presentaron diferencias significativas entre en los sitios industriales y urbano-industriales. (+) Se presentaron alteraciones en relación a valores de referencia.	(-) No existen otros estudios en la región.	(+) Gradiente claro de alteración en relación a la actividad industrial.	(+) La inhibición del la actividad ALAD puede alterar los niveles de hemoglobina y hematocrito en anfibios. (±) Algunos compuestos como el DDT y el Lindano pueden alterar los parámetros hematológicos.	(-) Respuesta no específica.	(±) Respuesta análoga en estudios in vitro y de campo en vertebrados expuestos a múltiples compuestos.
	Factor de condición	(+) Se presentaron diferencias significativas entre los sitios industriales.	(-) No existen otros estudios en la región.	(+) Gradiente claro de alteración en relación a la actividad industrial.	(±) Algunos compuestos como el DDT y el Lindano, el Plomo pueden alterar el metabolismo o la adsorción de nutrientes.	(-) Respuesta no específica.	(±) Respuesta análoga en estudios in vitro y de campo en vertebrados expuestos a múltiples compuestos.
	Posibles efectos	(+) Las concentraciones de DDT, Lindano y Mirex en tejido mostraron potencial de riesgo. (+) PCB's sin potencial de riesgo (+) Las concentraciones de plomo en sangre mostraron potencial de riesgo.	(-) No existen otros estudios en la región. (+) Correspondencia con los efectos hematológicos.	(-) Datos insuficientes para COP's. (+) Gradiente claro de incremento en el coeficiente de peligrosidad en relación a la actividad industrial.	(-) Grado de Incertidumbre alto por extrapolación entre especies.	(-) Respuesta no específica.	(-) No existe información sobre cargas corporales y letalidad en anfibios adultos.

(+) Indica que la evidencia es consistente con la ocurrencia del efecto.
 (-) Indica que la evidencia es inconsistente con la ocurrencia del efecto.
 (±) Indica que la evidencia es ambigua.

Referencias bibliográficas

- Albert L (1996) Persistent pesticides in Mexico. *Rev Environ Contam Toxicol* 147:1-44
- Andersen JB, Hedrick MS, Wang T (2003) Cardiovascular responses to hypoxia and anaemia in the toad *Bufo marinus*. *J. Exp. Biol.* 206, 857-865.
- Arrieta MA, Apartin C, Rosenberg CE, Fink NE, Salibian A (2001) Blood lead content in peri-urban population of the South American toad *Bufo arenarum*. *The Science of the Total Environment*. 271, 99.
- Arrieta MA, Bruzzone L, Apartin C, Rosenberg CE, Fink NE, Salibián A (2004) Biosensors of Inorganic Lead Exposure and Effect in an Adult Amphibian. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*. 46, 224-230.
- Arrieta MA, Peri SI, Apartin C, Rosenberg CE, Fink NE, Salibian A (2000) Blood lead concentration and delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in adult *Bufo arenarum*. *Arch. Physiol. Biochem.* 108, 275-280.
- ATSDR (2000) *Toxicological profile for Polychlorinated Biphenyls*. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry.
- ATSDR (2005) *Toxicological profile for Lead*. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry.
- ATSDRa (2002) *Toxicological profile for Hexachlorobenzene*. Department of Health and
- ATSDRb (2002) *Toxicological profile for DDT, DDE*. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry.
- Aylward Lesa L, Hays Sean M, Karch Nathan J, and Paustenbach Dennis J (1996) Relative Susceptibility of Animals and Humans to the Cancer Hazard Posed by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Using Internal Measures of Dose. *Environ. Sci. Technol.* 30:3534-3543.
- Bahena-Manjarrez JL, Rosales-Hoz L, Carranza-Edwards A (2002) Spatial and temporal variation of heavy metals in a tropical estuary. *Environ. Geol.* 42, 575-582.
- Bernanke J, Köhler H-R (2009) *The Impact of Environmental Chemicals on Wildlife Vertebrates*. 1-47 pp.
- Beyer WN, Cromartie EJ (1987) A survey of Pb, Cu, Zn, Cd, Cr, As, and Se in earthworms and soil from diverse sites. *Environ. Monit. Assess.* 8, 27-36.

Blake A (2005) *The next generation of POP's: PBDE's and Lindane. International POP's Elimination Network (IPEN)*. Washington D.C. USA. 15 p.

Bozada LM y F Bejarano (2006) *Los contaminantes orgánicos persistentes en el istmo mexicano*. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México. RAPAM. México, D.F. 79 p.

Bozada Robles L y Namihura-Santillan P (2005) El derrame de petróleo de 22 de diciembre de 2004 en la cuenca baja del río Coatzacoalcos: estudio de caso. 681-696 pp. AV Botello, J Rendón-Von Osten, G Gold-Bouchot y C Agraz-Hernández (Eds). *Golfo de México Contaminación e Impacto ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Autónoma de México, Instituto de Ecología. 696p.

Brauner CJ & Wang T (1997) The Optimal Oxygen Equilibrium Curve: A Comparison Between Environmental Hypoxia and Anemia. *Amer. Zool.* 37, 101-108.

Buccini J (2003) The development of a global treaty on persistent organic pollutants (POPs). In: Fiedler H (ed) *The handbook of environmental chemistry vol. 3, part O: persistent organic pollutants*. SpringerVerlag Berlin Heidelberg, pp 13-30.

Buekers J, Steen Redeker E, Smolders E (2009) Lead toxicity to wildlife: Derivation of a critical blood concentration for wildlife monitoring based on literature data. *Sci. Total Environ.* 407, 3431-3438.

Burger J (2006) Bioindicators: Types, Development, and Use in Ecological Assessment and Research. *Environ Bioindic.* 1, 22-39.

CECODES (1988) *Medio Ambiente en Coatzacoalcos*. Centro de Ecodesarrollo. D. F. México. 86 p.

Celis L, AV Botello, M Mendelewicz, y G Díaz (1987) Actividades del proyecto CARIPOL en la zona costera de México: 1. Hidrocarburos disueltos. *Caribbean Journal of Science.* 23(1):11-18.

Chapman LJ & McKenzie DJ (2009) Chapter 2 Behavioral Responses and Ecological Consequences. In: Dr. Jeffrey G. Richards, DAPF, Dr. Colin, JB (Eds.). *Fish Physiol.* Academic Press, pp. 25-77.

Collins AR, Azqueta AO, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Štětina R (2008) Comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* 23:143-151. doi: 10.1093/mutage/gen051.

Collins JP, Storfer A (2003) Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity & Distributions.* 9, 89-98.

CONAPO (2000) *Consejo Nacional de Población. Índices de Marginación 2000*. disponible on-line: <http://www.conapo.gob.mx/00cifras/2000.htm>

DeGarady R & Halbrook (2004) Impacts from PCB accumulation on amphibians inhabiting streams flowing from the Paducah Gaseous Diffusion Plant. *Arch. Environ Contam Toxicol.* 45:525-532.

Dhawan A, Bajpayee M Devendra P (2009) Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol.* 25:5-32.

DiGangi J & J Petrlink (2005) *The egg report. International POP's Elimination Network (IPEN)*. Washington D.C. USA. 52p.

Dohm MR, Mautz WJ, Doratt RE, Stevens JR (2008) Ozone exposure affects feeding and locomotor behavior of adult *Bufo marinus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1209-1216.

EPA (1998) *Guidelines for Ecological Risk Assessment. Environmental Protection Agency*. USA. 112 p.

Espinosa-Reyes G, Ilizaliturri CA, González-Mille DJ, Costilla R, Díaz-Barriga F, Cuevas MC, Martínez MA, and Mejía-Saavedra J (2010) DNA damage in earthworms (*Eisenia* spp.) as an indicator of environmental stress in the industrial zone of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Journal of Environmental Science and Health Part A.* 45, 49–55. doi: 10.1080/10934520903388731.

Evans M & Lampo M (1996) Diet of *Bufo marinus* in Venezuela. *J. Herpetol.* 30, 73-76.

Feder ME & Burggren WW (1992) *Environmental physiology of the amphibians*. University of Chicago Press, Chicago.

Flores J & Albert LA (2004) *Environmental Lead in Mexico, 1990–2002*. pp. 37-109.

Flores, O & P Geréz (1994) *Biodiversidad y conservación en México, Vertebrados, Vegetación y uso del suelo*. 88 Pág.

Gans C & Gorniak GC (1982) Functional morphology of lingual protrusion in marine toads (*Bufo marinus*). *Am J Anat.* 163, 195-222.

García, E (2004) *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. 4ª Edición. Offset Larios. México. D. F. 218 p.

Gaskell M, McLuckie KIE. & Farmer PB (2005) Comparison of the repair of DNA damage induced by the benzene metabolites hydroquinone and p-benzoquinone: a role for hydroquinone in benzene genotoxicity. *Carcinogenesis.* 3(26):673—680.

Goede, RW & BA Barton (1990) Organismic indices and an autopsy based assessment as indicators of health and condition of fish. *Americ. Fish. Soc. Sym.* 8:123-144.

Gómez-Pompa A (1980) *Ecología de la vegetación del estado de Veracruz*. Ed. C.E.C.S.A. Xalapa, Veracruz, México. 91 p.

Hall FG (1966) Hemoglobin functions in the blood of *Bufo marinus*. *J. Cell. Physiol.* 68, 69-73.

Harris ML, Bishop CA, Struger J, Van Den Heuvel MR, Van Den Kraak MR, Dixon GJ, Ripley B, Bogart JP (1998) The functional integrity of northern leopard frog (*Rana pipiens*) populations in orchard wetlands. I. Genetics, physiology, and biochemistry of breeding adults and young-of-the-year. *Environ Toxicol Chem.* 17:1338–1350

Hopkins WA (2007). *Amphibians as models for studying environmental change*. ILAR J 48, 270-277.

Ilizaliturri C, González-Mille D, Pelallo N, Domínguez G, Pérez-Maldonado I, Mejía-Saavedra J, Batres L, Díaz-Barriga F, Espinosa-Reyes G (2009) Revisión de las metodologías sobre evaluación de riesgos en salud para el estudio de comunidades vulnerables en América Latina. *Interciencia*. 34(10) 710-717.

INE (2005). *Diseño y aplicación de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios peligrosos de México*. Instituto Nacional de Ecología

INEGI (1994) *XIV censo industrial, XI censo comercial y XI censo de servicios*. Censos Económicos 1994 Veracruz. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.

INEGI (2005) *Principales resultados por localidad 2005 (ITER), Veracruz de Ignacio de la Llave*. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI).

INEGI (2007) *Anuario Estadístico Veracruz de Ignacio de la Llave*. Edición 2007. Ganadería. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.

IPEN (2005) *The Egg Report: Contamination of chicken eggs from 17 countries by dioxins, PCBs and hexachlorobenzene*. The International POP's Elimination Network. 52 p.

Jofré M, Antón R, Caivedes-Vidal (2008) Organochlorine Contamination in Anuran Amphibians of an Artificial Lake in the Semiarid Midwest of Argentina. *Arch Environ Contam Toxicol*. 55:471-480.

Lee RF & Steinert S (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Res*. 544:43-64

Lee YH & Stuebing RB (1990) Heavy metal contamination in the River Toad, *Bufo juxtasper* (Inger), near a copper mine in East Malaysia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 45, 272-279.

Lieven B & Ronny B (2003) Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor, *Environmental Pollution*.126(1):9-19. DOI: 10.1016/S0269-7491(03)00173-8.

Linder G, Krest SK, Sparling DW, Johnson F (2003) *Amphibian decline: an integrated analysis of multiple stressor effects*. SETAC Press, Pensacola, Fla., 368 pp.

Linzey D, Burroughs J, Hudson L, Marini M, Robertson J, Bacon J, Nagarkatti M, Nagarkatti P (2003) Role of environmental pollutants on immune functions, parasitic infections and limb malformations in marine toads and whistling frogs from Bermuda. *Int. J. Environ. Health Res*. 13, 125-148.

López-Portillo, E (2000) *Río Coatzacoalcos*. (Serie Ríos de México). Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa –Online Communications-México.

Loveridge R, Bishop C, Elliott J, Kennedy C (2007) Polychlorinated Biphenyls and Organochlorine Pesticides Bioaccumulated in Green Frogs, *Rana clamitans*, from the Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. *Bull Environ Contam Toxicol*. 79: 315-318.

Macauley J, Harwell L, Alafita H (2007) The Ecological Condition of Veracruz, Mexico Estuaries. *Environ. Monit. Assess*. 133, 177-185.

McCoy KA, Bortnick LJ, Campbell CM, Hamlin HJ, Guillette LJ, St Mary CM (2008) Agriculture Alters Gonadal Form and Function in the Toad *Bufo marinus*. *Environ. Health Perspect.* 116, 1526-1532.

Mckelvey-Martin, VJ, MHL Green, P Schmezer, BL Pool-Zobel, MP De Méo & A Collins (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mut. Res.* 288: 47-63.

Moraes R, Gerhard P, Andersson L, Sturve J, Rauch S, Molander S (2003) Establishing causality between exposure to metals and effects on fish. *Hum Ecol Risk Assess.* 9:149-169.

Morales MA, Herrero VM, Martínez SA, Rodríguez MG, Valdivieso E, García G, Elías MA. (2006) Cleaner production and methodological proposal of eco-efficiency measurement in a mexican petrochemical complex. *Water Sci Tech.* 53: 11-16

Oakley G, Devanaboyina U, Robertson L y Gupta R (1996) Oxidative DNA Damage Induced by Activation of Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Implications for PCB-Induced Oxidative Stress in Breast Cancer. *Chemical Research in Toxicology.* (9) 1285-1292.

OPS 1999 *Metodología de Identificación y Evaluación de Riesgos para la Salud en Sitios Contaminados*. Ops/Cepis/Pub/99.34. Lima, Perú. 42 p.

Pelcastre-Villafuerte L y OA Flores-Villela (1992) *Lista de especies y localidades de recolecta de la Herpetofauna de Veracruz, México*. Publicación Especial Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera" Fac. Ciencias UNAM.

Pereira J, R Mercalado, C Kuropat, D Luedke, G Senne (1993) Effects of cadmiun accumulation on serum vitelogenin levels and hepatosomatic and gonadosomatic indices of winter flounder. *Env.Toxicol.* 24: 427-431.

Perí SI, Arrieta MA, Fink NE, Salibián A (1998a) Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) activity in blood of *Bufo arenarum* (Anura). *Biol Res.* 31, 339-342.

Perí SI, Fink NE, Salibián A (1998b) Hematological parameters in *Bufo arenarum* injected with sublethal dose of lead acetate. *Biomedical And Environmental Sciences.* 11, 70-74.

Pörtner HO, Maclatchy LM, Toews DP (1991) Metabolic responses of the toad *Bufo marinus* to environmental hypoxia : an analysis of the critical Po₂. *Physiol. Zool.* 64, 836-849.

Rice TM, Blackstone BJ, Nixdorf WL, Taylor DH (1999) Exposure to lead induces hypoxia-like responses in bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*). *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2283-2288.

Rojas E, MC López, M Valverde (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr B.* 722: 225-254.

Romero-Almaráz M, C Sánchez-Hernández, C García-Estrada, R Owen (2000) *Mamíferos pequeños: Manual de técnicas de captura, preparación, preservación y estudio*. UNAM. México. D. F.151 p.

Rosales L y Carranza E (2005) Estudio geoquímico de metales en el estuario del río Coatzacoalcos. p. 389-406. A.V. Botello, J. Rendón-Von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds). *Golfo de México Contaminación e Impacto ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Autónoma de México, Instituto de Ecología. 696p.

Rosales-Hoz L, Carranza-Edwards A (1998) Heavy Metals in Sediments from Coatzacoalcos River, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 553-561.

Rosales-Hoz L, Carranza-Edwards A, Carvajal-Romero P, Mendez-Jaime C, Ruiz-Santoyo ME (2003) Physico-chemical seasonal variability of a tropical estuary: major and minor elements in water and air. *Environ. Geol.* 44, 790-798.

Rosales-Hoz L, Cundy AB, Bahena-Manjarrez JL (2003) Heavy metals in sediment cores from a tropical estuary affected by anthropogenic discharges: Coatzacoalcos estuary, Mexico. *Estuarine Coastal & Shelf Science.* 58, 117.

Rosenberg CE, Perú SI, Arrieta MA, Fink NE, Salibián A (1998) Red Blood Cell Osmotic Fragility in *Bufo arenarum* Exposed to Lead. *Arch. Physiol. Biochem.* 106, 19.

Rowe CL, Hopkins WA, Coffman VR (2001) Failed recruitment of southern toads (*Bufo terrestris*) in a trace element-contaminated breeding habitat: direct and indirect effects that may lead to a local population sink. *Arch Environ Contam Toxicol.* 40, 399-405.

Ruelas-Inzunza J, Gárate-Viera Y, Páez-Osuna F (2007) Lead in clams and fish of dietary importance from Coatzacoalcos estuary (Gulf of Mexico), an industrialized tropical region. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 508-513.

Ruelas-Inzunza J, Páez-Osuna F, Zamora-Arellano N, Amezcua-Martínez F, Bojórquez-Leyva H (2009) Mercury in Biota and Surficial Sediments from Coatzacoalcos Estuary, Gulf of Mexico: Distribution and Seasonal Variation. *Water, Air, Soil Pollut.* 197, 165-174.

Russell R, Lipps G, Hecnar S, Haffner D (2002) Persistent Organic Pollutants in Blanchard's Cricket Frogs (*Acris crepitans blanchardi*) from Ohio. *Ohio J Sci.* 102 (5):119-122.

Russell RW, Gillan KA, Haffner GD (1997) Polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in southern Ontario, Canada, green frogs. *Environ Toxicol Chem.* 1:2258–2263.

Rzedowski, J (1978) *Vegetación de México*. Limusa. México. 432 pp.

Sakai T, Morita Y (1996) delta-aminolevulinic acid in plasma or whole blood as a sensitive indicator of lead effects, and its relation to the other heme-related parameters. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 68, 126-132.

Schwartz J, Landrigan PJ, Baker EL (1990) Lead-induced anemia: Dose-response relationships and search for a threshold. *Am J Public Health.* 80: 165-168.

Shugart, LR (2000) DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology* 9:329-340. doi: 10.1023/A:1026513009527.

Sparling DW, Linder G, Bishop CA (2000) *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, Fla.

Speit, G & A Hartmann (1999) The comet assay (Single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair. *Method. Mol. Biol.* 113: 203-212.

Stevenson RD & Woods WA, Jr (2006) Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integr. Comp. Biol.* 46, 1169-1190.

Stringer R, I Labunska, K Bridgen (2001) *Organochlorine and heavy metals contaminants in the environmental around the Complejo Petroquímicos Paharitos, Coatzacoalcos, México*. Nota técnica Greenpeace. University of Exeter. Unit Kingdom. 60 p.

Suter II, G (1993) *Ecological Risk Assessment*. Lewis Publishers. United Stated. 538 pp.

Sutter II G (2007) *Ecological risk assessment*. 2nd ed. CRC Press, Florida, 643 pp.

Tice, RR, E Agurell, D Andreson, B Burlinson, A Hartmann, H Kobayashi, Y Miyamae, E Rojas, JC Ryu, F Sasaki (2000) Single cell gel / Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mut.* 35: 206-221.

Triebkorn R, Böhmer J, Braunbeck T, Honnen W, Köhler H-R, Lehmann R, Oberemm A, Schwaiger J, Segner H, Schüürmann G, Traunspurger W (2001) The project VALIMAR (VALIdation of bioMARKers for the assessment of small stream pollution): objectives, experimental design, summary of results, and recommendations for the application of biomarkers in risk assessment. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health) 8, 161-178.

Van der Schalie WH, Gardner HS, Jr, Bantle JA, De Rosa CT, Finch RA, Reif JS, Reuter RH, Backer LC, Burger J, Folmar LC, Stokes WS (1999) Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environ. Health Perspect.* 107, 309-315.

Vázquez-Botello, A y F Páez (1986) *La contaminación: el problema crucial*. Vol. 1. Centro de ecodesarrollo. México. 140 p.

Vázquez-Botello, A, S Villanueva-Fragoso, L Rosales-Hoz (2004) *Distribución y contaminación por metales en el Golfo de México*. pp. 682-712. En: Diagnostico ambiental del Golfo de México. Compiladores: Caso, M. I. Pisanty; E. Ezcurra. Editado por: SEMARNAT-INE.

Venne L, Anderson T, Zhang B, Smith L, McMurry S (2008) Organochlorine pesticide concentrations in sediment and amphibian tissue in playa wetlands in the southern high plains, USA. *Bull Environ Toxicol.* 80: 497-501.

Venturino A, Rosenbaum E, De Castro AC, Anguiano OL, Gauna L, De Schroeder TF, De D'Angelo AMP (2003) Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers* 8, 167-186.

Walker CH (2009) *Organic pollutants: an ecotoxicological perspective*. 2nd edn. CRC Press Boca Raton, FL, 408 pp.

Wang B, Yu G, Huang J, Hu H (2008) Development of species sensitivity distributions and estimation of HC₅ of organochlorine pesticides with five statistical approaches. *Ecotoxicology*. 17:716–724.

Wayne R Munns, Jr, Robert Kroes, Gilman Veith, Glenn W. Suter II, Terri Damstra and Michael D Waters (2003) Approaches for Integrated Risk Assessment. *Human and Ecological Risk Assessment*. 9(1) 267-272.

Willett KL, Ulrich EM, Hites RA (1998) Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environ Sci Technol*. 32:2197-2207.

Wood S & Malvin G (1991) Physiological significance of behavioral hypothermia in hypoxic toads (*Bufo marinus*). *J. Exp. Biol*. 159, 203-215.

Wood SC (1990) Effect of hematocrit on behavioral thermoregulation of the toad *Bufo marinus*. *Am J Physiol*. 258, R848-851.

Wood SC (1991) Interactions between Hypoxia and Hypothermia. *Annu. Rev. Physiol*. 53, 71-85.

Wood SC, Gonzales R (1996) Hypothermia in hypoxic animals: mechanisms, mediators, and functional significance. *Comp Biochem Physiol*. 113, 37-43.

Yim UH, Hong SH, Shim WJ, Oh JR (2005) Levels of persistent organochlorine contaminants in fish from Korea and their potential health risk. *Arch Environ Contam Toxicol*. 48:358–366. doi: 10.1007/s00244-004-0085-1.

Yin X, Li S, Zhang L, Zhu G, Zhuang H (2008) Evaluation of DNA damage in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) after in vivo exposure to sublethal concentrations of four herbicides using the comet assay *Ecotoxicology*. 17:280-286.

Zitko V (2003a) *Chlorinated pesticides: aldrin, DDT, endrin, dieldrin, mirex In: The handbook of environmental chemistry vol. 3, part O Persistent Organic Pollutants* (ed. by H. Fiedler). SpringerVerlag Berlin Heidelberg, pp 47-90.

Zitko V (2003b) *Hexachlorobenzene in: The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 3, Part O Persistent Organic Pollutants* (ed. by H. Fiedler). SpringerVerlag Berlin Heidelberg, pp 91-122.

Zug GR, Zug PB (1979) *The marine toad, Bufo marinus: a natural history resumé of native populations*. Smithsonian Institution Press, Washington.

Zupanovic Z, Musso C, Lopez G, Louriero CL, Hyatt AD, Hengstberger S, Robinson AJ (1998) Isolation and characterization of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Dis. Aquat. Org*. 33, 1-9.

Anexo 1. Técnicas de análisis

Metodologías de obtención y análisis de la información

Técnicas de captura de organismos

Se utilizaron trampas de barrera y embudo para la captura de los sapos gigantes. Las trampas se elaboraron de material plástico como barrera y botes de 20L como recipientes de colecta. La trampa está conformada por tres vértices con una extensión de cinco metros por vértice. La técnica consiste en colocar las trampas de barrera sobre las orillas de las riberas o de las charcas. La disposición de la trampa fue en forma lineal o de forma cruzada, dependiendo del terreno. Se colocaron un total de 4 trampas por estación de muestreo. Las trampas fueron colocadas por la tarde y revisadas en el transcurso de la noche y por la mañana. La trampa forzó a los sapos a caer en los recipientes dirigidos por la barrera plástica en su camino hacia tierra firme, posteriormente se colectaron a mano. También, se realizaron trayectos nocturnos en áreas de 1ha en las zonas pantanosas; los individuos identificados fueron recolectados a mano y con red. Los organismos colectados fueron transportados al laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana para la obtención de muestras.

Permisos de colecta

Para la captura de los organismos se contó con Licencia de Colector Científico de Flora y Fauna silvestre y otros Recursos Biológicos Silvestres No. FAUT-0133 (Oficio Num. SGPA/DGVS/06381), vigente durante los años 2006-2008, la cual fue expedida por la Secretaria de Medioambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

Obtención de muestras ambientales

Se colectaron 3 muestras de suelo superficial (los primeros 5 cm) en cada sitio. Las muestras fueron homogenizadas para formar una muestra compuesta. Las muestras fueron almacenadas en frascos de vidrio para su transporte al laboratorio. En el laboratorio, las muestras fueron secadas a 30C° en un horno; después, se tamizaron y finalmente, se almacenaron hasta su análisis.

Obtención de muestras biológicas

El método de obtención y conservación de las muestras de sangre se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de Dyer y Cervasio (2008) para estudios de hematología. Se obtuvieron de 3 a 5 ml de sangre por punción cardiaca con jeringas heparinizadas; posterior a la extracción la sangre, y ésta se almacenó en tubos (Vacutainer®) con heparina y. las muestras se mantuvieron en refrigeradas a 8°C. No se utilizó EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) como anticoagulante ya que no es recomendable debido a que inhibe la actividad δ -ALAD y puede lisar los eritrocitos de algunas especies de anfibios y reptiles (Dyer y Cervasio, 2008). Una alícuota de 2 ml fue congelada con nitrógeno líquido para su posterior análisis (actividad δ -ALAD). Después de la extracción de sangre, los sapos fueron sacrificados por dislocación cervical y diseccionados para la obtención de tejidos (hepático, muscular y graso). Los tejidos fueron almacenados en frascos de vidrio y congelados a 4°C para el posterior análisis de contaminantes.

Análisis de contaminantes en muestras ambientales

Metales y metaloides

La cuantificación de metales y metaloides en suelo se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica. Para Pb y Cd se utilizó el horno de grafito, mientras que para As, Cu y Zn se utilizó generación de hidruros. Se pesaron 0.5 g de suelo en vasos de teflón y se le agregaron 10 ml de ácido nítrico al 25%. La digestión se llevó a cabo en un microondas (CEM MDS-2000) a 100% de potencia, 80 psi y un tiempo de 60 minutos. AL terminar la digestión, las muestras se llevaron a temperatura ambiente para su enfriamiento. Posteriormente, las muestras se filtraron con papel Watman (No 1). El filtrado fue almacenado en tubos cónicos de polipropileno ajustando el volumen a 25ml con agua desionizada. Como control de calidad se utilizó el Estándar de referencia 2710 del NIST (National Institute of Standards and Technology, Montana Soil). Las concentraciones fueron expresadas en mg/Kg.

Compuestos Orgánicos Persistentes (COP's)

El proceso de extracción de contaminantes del suelo fue por horno de microondas (CEM-MARS X) de acuerdo a los métodos 8081A y 8270C de la USEPA (1996a, b) con ligeras modificaciones. Se colocó un gramo de muestra en vasos de teflón y se añadieron 14 mL de diclorometano, las condiciones del horno fueron temperatura de 120°C, 140psi de presión en un tiempo de 60 minutos. Después de la extracción las muestras se evaporaron hasta un volumen de 0.2 mL con una corriente de nitrógeno en un evaporador a 37°C; durante el proceso las muestras se re-suspendieron a 2 mL con hexano. Finalmente, el extracto se pasó por una columna de fluorisil eluyendo con dietileter (6%) para su limpieza. El extracto se concentró a un volumen de 1 mL mediante una corriente de nitrógeno. El endrin-C13 y el PCB 14-C13 fueron utilizados como estándares internos y fueron adicionados a todas las muestras. Se utilizó además un estándar de referencia certificado (EC-2 "A Lake Ontario Blended Sediment for Toxic

Organics”) del National Water Research Institute de Canadá. Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico.

La cuantificación se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Trejo-Acevedo et al. (2009). Una vez realizada la extracción correspondiente, 1 µL del extracto fue inyectado en un cromatógrafo de gases (HP 6890) acoplado a un espectrómetro de masas (HP 5973) con una columna HP5-MS (60 m x 0.25 mm ID; 0.25-µm film thickness). El programa de temperaturas utilizado fue: inicial 100°C (2 min) y final de 310°C (a tasas de incremento de la temperatura de: 20°C/min hasta 200°C, 10.0°C/min hasta 245°C, 4°C/min hasta 280°C y 30°C/min hasta 310°C por 6 min). El gas acarreador utilizado fue helio a una velocidad lineal de 1 mL/min. El límite de detección para los COP´s fue de 0.6 a 2 µg/L. Las concentraciones fueron expresadas en ng/g.

Métodos de análisis de biomarcadores de exposición

Plomo en sangre

Los niveles de plomo en sangre fueron determinados siguiendo el protocolo de Subramanian (1987, 1989). Se mezcló modificador de matriz (hidrogenofosfato diamónico-Triton X-100 en presencia de 0,2% de ácido nítrico) con las muestras de sangre en una proporción 1:5. Se utilizó material de referencia (CDC-08PB06) en cada corrida como un control de calidad interno y se obtuvieron con recuperaciones que van desde 91 hasta 100%. Las muestras de sangre fueron analizadas con un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 3110 acoplado a un horno de grafito (HGA 600, Perkin Elmer). Las concentraciones de plomo en muestras de sangre fueron expresadas en µg/dL.

Contaminantes orgánicos persistentes (COP's)

El método de extracción, separación y limpieza de contaminantes orgánicos persistentes en los tejidos de sapo gigante fue llevado a cabo de acuerdo a lo establecido por Jensen y colaboradores (2003) con ligeras modificaciones. Las muestras de tejido (10g para hígado, 10g para músculo y 1g para grasa) fueron homogenizadas y extraídas con isopropanol/dietileter/hexano (2:1:1 v/v). Posteriormente el extracto fue filtrado y usado para la determinación gravimétrica de lípidos totales. El extracto fue evaporado a 37°C hasta un volumen de 0.5mL. La limpieza se realizó a través de una columna de silica gel. Después las muestras fueron eluidas con una mezcla de metileno:hexano (3:1 v/v) y concentradas a 100 µL. Para el caso de muestras de sangre, la extracción se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido por (Trejo-Acevedo, et al 2009); una alícuota de 2mL de plasma fue extraída con una mezcla de amonio/etanol/hexano (1:1:3 v/v). El extracto fue concentrado y limpiado en columnas de Florisil. El contenido de lípidos en plasma fue determinando por espectrofotometría.

Para la cuantificación de contaminantes, el extracto de las muestras (1 µL) fue inyectado en un cromatógrafo de gases (HP 6890) acoplado a un espectrómetro de masas (HP 5973) y una columna HP5-MS (60 m x 0.25 mm ID; 0.25-µm film thickness). El programa utilizado de temperaturas fue: Inicial 100°C (2 min) y final de 310°C (a tasas de incremento de la temperatura de: 20°C/min hasta 200°C, 10.0 °C/min hasta 245°C, 4.0 °C/min hasta 280°C y 30°C/min hasta 310°C por 6 min). Se utilizó Helio como gas acarreador a una velocidad lineal de 1.0mL/min. El α -Hexachlorociclohexano-C13, Endrin-C13 y el PCB-141-C13 se utilizaron como estándares internos y fueron adicionados a todas las muestras. Los límites de detección para los pesticidas organoclorados (OC's) y PCB's fue aproximadamente de 0.30 µg/L. Las concentraciones de COP's en los diferentes tejidos fueron calculadas en peso fresco y estandarizadas por el contenido de lípidos (ng/g de lípidos).

Métodos de análisis de biomarcadores de efecto

Ensayo cometa

El ensayo cometa fue realizado de acuerdo a lo descrito por Singh et al. (1988) con ligeras modificaciones. Una alícuota de 5 μ L de sangre completa fue diluida en 240 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (37°C). Las laminillas fueron preparadas usando 15 μ L de la suspensión celular y 225 μ L de agarosa de bajo punto de fusión en una capa pre-elaborada de agarosa regular al 0.5%. Posteriormente las laminillas fueron incubadas en una solución de lisis [(compuesta de 10 mM Tris-HCl, 2.5 M NaCl, y 100 mM EDTA, 0.2 M NaOH, ajustada a un pH 10) a la cual se le añadió 10% de DMSO y 1% Triton X-100 antes de usarse] por 1 semana en oscuridad a una temperatura de 8°C. Después de la incubación las laminillas fueron puestas en un buffer alcalino (10N NaOH y 200 mM EDTA, ajustado a un pH > 13) por 5 minutos para desdoblar el ADN. Inmediatamente se realizó una electroforesis horizontal por 10 minutos a 25 V y 300 mA, posteriormente se neutralizaron con Tris 0.4 M (pH 7.5) y se fijaron con etanol. Las laminillas se tiñeron con 20 μ L de bromuro de etidio (0.05mM) para su observación en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400) a una magnificación de 200X. Se midió el momento (olive tail moment) [(tail mean–head mean)*tail%DNA/100] y la longitud de la cola (tail extent) de 100 células (50 de la muestra y 50 de la réplica) por individuo con un software analizador de imágenes (Komet 4.0; Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK).

Determinación de la actividad δ -ALAD

La actividad de la enzima delta aminolevulínico deshidratasa (δ -ALAD) fue determinada de acuerdo al método europeo estandarizado (Berlin and Schaller 1974) con ligeras modificaciones. Una alícuota de 0.05 mL de sangre fue mezclada con 1.45 mL de agua desionizada (30:1 water: blood dilution ratio) y se añadió 1mL de ácido aminolevulínico (ALA) 10 mM en un buffer de fosfatos ajustado a un pH de 6.4. Las muestras fueron incubadas en baño húmedo a 38°C por 60 minutos. La reacción fue detenida con ácido

tricloroacético (10%); posteriormente, las muestras fueron centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm (Hettich Universal 32). El sobrenadante fue mezclado con la solución de Erlich's (1:1). Después de diez minutos se midió la absorbancia a 555 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Barnstead/Thermolyne SP8001). La actividad enzimática fue expresada como $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{L}$ de eritrocitos y fue calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de la } \delta\text{-ALAD} = \text{Abs} \times 100 \times 2 \times \text{FD}/\text{Htc}\% \times 60 \times 0.062$$

Donde Abs= Absorbancia de la muestra, 2= (Factor de conversión de δ -ALAD a Porfobilinógeno), FD= Factor de dilución, 60 = Tiempo de incubación (min), y 0.062= coeficiente de extinción ($\text{L}/\mu\text{mol} \times \text{cm}$).

Determinación del contenido de hemoglobina, hematocrito y hemoglobina corpuscular media

El hematocrito fue determinado centrifugando la sangre en tubos capilares heparinizados (50 μL de capacidad) a 7000 rpm por 5 minutos en una centrífuga para hematocrito (Sol Bat M-08). La medición fue realizada con una carta estándar de hematocrito (Critocaps® tube reader). El contenido de hemoglobina (g/dL) fue medido usando un kit de diagnóstico (HemoCue Hb 201 Microcuvettes® and HemoCue Hb 201 Analyzer®). El ensayo fue realizado de acuerdo al protocolo del manual de operación del instrumento. La hemoglobina corpuscular media (CHCM) se obtuvo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{MCHC} [\text{g}/\text{dL}] = \text{hemoglobina} [\text{g}/\text{dL}] \div \text{hematocrito} [\% \text{ transformado a L/L}].$$

Factor de condición y otros índices organosomáticos

Se calculó el factor de condición de acuerdo a Nash (2006). La longitud hocico-cloaca (LHC) se midió con un vernier digital (0.01 mm de precisión) y el peso eviscerado (PE) del organismos se registró con una balanza electrónica (0.1g de precisión). El factor de condición de Fulton (K) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$K = [PE/LHC] \times 100$$

Posibles efectos en el crecimiento la sobrevivencia y/o la fecundidad

Debido a que no existen valores tóxicos de referencia (TRV's) para la concentración de Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP's) en tejido se calcularon las concentraciones peligrosas al 5% (HC₅) con modelos de distribución de la sensibilidad de las especies (SSD's). Los modelos SSD fueron realizados con el software SSD de Intrinsic (2007) y fueron alimentados con datos disponibles de la literatura. Las HC₅ fueron comparadas con los niveles de COP's de los sapos por medio del cálculo de cocientes de peligrosidad (CP) de acuerdo a la siguiente fórmula: $CP = C_b / HC_5$ en donde C_b es la concentración máxima de COP's para la población de sapos gigantes (asumiendo máximo riesgo) y la HC₅ es la concentración peligrosa al 5%.

Para el caso de plomo en sangre, Buekers et al. (2009) ha propuesto niveles de protección de toxicidad al plomo para mamíferos (18 µg/dL), basados en valores de concentración de no efecto (NOEC) provenientes de 15 especies diferentes de mamíferos para efectos reproductivos y hematológicos. En esta investigación se comparó los niveles de plomo en sangre de los sapos gigantes de Coatzacoalcos con los niveles de protección de toxicidad al plomo propuestos por Buekers et al. (2009) por medio del cálculo de cocientes de peligrosidad (CP) de acuerdo a la siguiente fórmula: $CP = C_b / C_r$ en donde C_b es la concentración máxima de plomo en sangre para la población de sapos gigantes (asumiendo máximo riesgo) y C_r es la concentración de referencia.

Bibliografía del Anexo

Berlin A, Schaller KH. (1974) European standardized method for the determination of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 12, 389-390.

Buekers J, Steen Redeker E, Smolders E (2009) Lead toxicity to wildlife: Derivation of a critical blood concentration for wildlife monitoring based on literature data. *Sci. Total Environ.* 407, 3431-3438.

Dyer SM, Cervasio EL (2008). An overview of restraint and blood collection techniques in exotic pet practice. *Vet Clin N Am Exotic Anim Pract.* 11:423–443.

Jensen S, Hägggerg L, Jörundsdóttir H, Odham G. (2003) A quantitative lipid extraction method for residue analysis of fish involving nonhalogenated solvents. *J. Agricultural and food chemistry.* 51(19): 5607-5611.

Nash R, Valencia A, Geffen A (2006) The Origin of Fulton's Condition Factor—Setting the Record Straight. *Fisheries.* 31 (5):236-238.

Singh NP, MT McCoy, RR Tice, EL Schneider (1988) A single technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175: 184-191.

Stephen D & Cervasio E (2008) An Overview of Restraint and Blood Collection Techniques in Exotic Pet Practice. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice.* 11(3)423-443. DOI: 10.1016/j.cvex.2008.03.008.

Subramanian KS (1987) Determination of lead in blood: Comparison of two GFAAS methods. *At. Spectrosc.* 8:7–14.

Subramanian KS (1989) Determination of lead in blood by graphite furnace atomic absorption spectrometry -- A critique. *The Science of The Total Environment.* 89, 237-250.

Trejo-Acevedo A, Díaz-Barriga F, Carrizales L, Domínguez G, Costilla R, Ize-Lema I, Yarto-Ramírez M, Gavilán-García A, Mejía-Saavedra JJ, Pérez-Maldonado IN (2009) Exposure assessment of persistent organic pollutants and metals in mexican children. *Chemosphere* 74:974-980. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.10.030

USEPA (1996a) Method 8081A: organochlorine pesticides by gas chromatography. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) 44 pp

USEPA (1996b) Method 8270c: semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) 54 pp.