



**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 FAUNA ACUÁTICA DE COATZACOALCOS, VERACRUZ**

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

**PRESENTA:**

**M. EN C. DONAJI JOSEFINA GONZÁLEZ MILLE**

**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 FAUNA ACUÁTICA DE COATZACOALCOS, VERACRUZ

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

PRESENTA:  
**M. EN C. DONAJI JOSEFINA GONZÁLEZ MILLE**

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:

DRA. MA. CATALINA ALFARO DE LA TORRE

\_\_\_\_\_

VOCAL:

DR. ISRAEL RAZO SOTO

\_\_\_\_\_

**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. 182027)**

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



## **DEDICATORIA**

*A César por su amor, apoyo y confianza, por compartir conmigo un logro más, por ser mi cómplice y sostén siempre. De nuevo lo logramos amor. Te amo*

*A mis padres por sus enseñanzas, amor, comprensión y apoyo durante toda siempre. Gracias los quiero mucho.*

*A mis hermanos (Naye, Yiyí, Palo y Dany) por estar siempre a mi lado y compartir conmigo. Los quiero mucho.*



## AGRADECIMIENTOS

Al programa de Posgrado Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales, en especial a todos aquellos profesores que con su experiencia y conocimientos contribuyeron en mi formación académica.

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo para la realización de este trabajo.

A la Facultad de Medicina y al Departamento de Toxicología Ambiental por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A la Universidad Veracruzana Campus Coatzacoalcos y en especial a la M. en C. María del Carmen Cuevas Díaz por su apoyo en la realización del trabajo.

Al personal del Centro de Estudios Tecnológicos del Mar (CETMAR) #15 por su ayuda en Coatzacoalcos, Veracruz.

Al Centro Acuícola "El Peaje" de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA) por su contribución en la realización de este trabajo.

Al Dr. Jesús Mejía por su tiempo, apoyo, colaboración y ayuda en la elaboración de este trabajo, así como por compartir su experiencia y conocimiento.

A mis asesores Dr. Fernando Díaz-Barriga y Dr. Gerardo Gold por todas las aportaciones realizadas a lo largo de esta investigación, las cuales fueron fundamentales para su realización.

A la Dra. Catalina Alfaro de la Torre y al Dr. Israel Razo por sus valiosos aportes y comentarios para el mejoramiento del presente trabajo.

Al Equipo de Ecotox por su trabajo, ayuda y apoyo en la realización de este trabajo.

A César por sus valiosas aportaciones y consejos a lo largo de este tiempo.

A todos los pescadores de la región de Coatzacoalcos, pues su ayuda fue fundamental para este trabajo.

A Don Ángel, Carriz e Izanami por su trabajo y apoyo en el laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio de Toxicología y del PMPCA por su apoyo y amistad.

A Memo, Gaby, Diana, Roy, Toño, Norma, Nadia, Rebeca y Edna por su amistad y todos los momentos compartidos durante este tiempo.

A todos aquellos que de alguna u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.



## Contenido

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
EVALUACIÓN DEL SITIO.....	7
Características generales del sitio.....	7
<i>Ubicación</i> .....	7
<i>Clima</i> .....	8
<i>Hidrología</i> .....	8
<i>Suelo</i> .....	8
<i>Vegetación</i> .....	9
<i>Fauna</i> .....	10
Actividades productivas en la zona de estudio.....	11
<i>Industrial</i> .....	11
<i>Agrícola</i> .....	11
<i>Ganadera</i> .....	11
<i>Turismo y Servicios</i> .....	12
Problemática del sitio.....	13
<i>Estudios en fauna acuática de la zona</i> .....	15
Análisis cartográfico y observaciones de campo.....	16
<i>Selección de sitios de muestreo</i> .....	17
<i>Monitoreo ambiental preliminar</i> .....	19
<i>Modelo preliminar del sitio</i> .....	21
<i>Diseño de muestreo</i> .....	22
<i>Contaminantes prioritarios</i> .....	23
<i>Selección de especies</i> .....	25
<i>Selección de biomarcadores</i> .....	28
Monitoreo ambiental.....	29
<i>Cociente de peligrosidad (CP)</i> .....	32



<i>Fuentes potenciales de COP's en la zona de estudio</i> .....	33
Monitoreo biológico .....	34
EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN .....	36
EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS .....	44
CARACTERIZACIÓN DE RIESGO .....	49
Líneas de evidencia .....	49
Modelo final del sistema acuático .....	51
Incertidumbres y Limitaciones .....	52
CONCLUSIONES GENERALES.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	55
ARTÍCULO .....	66
Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico .....	66
PRODUCTOS GENERADOS DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN .....	78
Artículos Científicos .....	78
Capítulos de libro.....	78
Informes Técnicos .....	79
ANEXO 1 .....	80
ANEXO 2.....	82
ANEXO 3.....	87
ANEXO 4.....	90



## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Empresas localizadas en la zona de Coatzacoalcos, Ver.....	12
<b>Cuadro 2.</b> Principales contaminantes reportados en el ambiente en la zona de Coatzacoalcos, Ver. ....	15
<b>Cuadro 3.</b> Contaminantes detectados en especies acuáticas de la zona de Coatzacoalcos, Ver .....	16
<b>Cuadro 4.</b> Sitios del muestreo preliminar en Coatzacoalcos, Ver. ....	18
<b>Cuadro 5.</b> Concentraciones de metales en sedimento obtenidas en el muestro preliminar del área de estudio .....	20
<b>Cuadro 6.</b> Concentraciones de COP's en sedimento obtenidas en el muestro preliminar del área de estudio .....	20
<b>Cuadro 7.</b> Concentraciones de metales en sedimento de Laguna del Ostión obtenidas en el muestro preliminar del área de estudio.....	23
<b>Cuadro 8.</b> Concentraciones of COP's en sedimento del área evaluada.....	31
<b>Cuadro 9.</b> Especies de peces capturados en el monitoreo biológico en la zona.....	35
<b>Cuadro 10.</b> Concentraciones de COP's en musculo de las especies colectadas en Coatzacoalcos, Ver. ....	38
<b>Cuadro 11.</b> ANOSIM para la comparación de contaminantes en tejido por especies and análisis SIMPER mostrando el grado de disimilaridad.....	41
<b>Cuadro 12.</b> Concentraciones de COP's en músculo de especies colectadas en Coatzacoalcos, Veracruz por habito alimenticio.....	41
<b>Cuadro 13.</b> Análisis de líneas de evidencia de riesgo para el sistema acuático del Coatzacoalcos, Ver .....	50
<b>Cuadro 14.</b> Incertidumbres y/o limitaciones detectadas en la evaluación de riesgo ecológico del sistema acuático de Coatzacoalcos, Ver.....	52





## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema general de la metodología de riesgo integrado.....	3
<b>Figura 2.</b> Localización del área de estudio en la región de Coatzacoalcos, Ver. ....	7
<b>Figura 3.</b> Localización del área industrial en la región de Coatzacoalcos, Ver.....	13
<b>Figura 4.</b> Localización de los sitios del muestreo seleccionados en la visita de reconocimiento. ....	17
<b>Figura 5.</b> Modelo conceptual preliminar del sitio con énfasis en el sistema acuático.....	22
<b>Figura 6.</b> Localización de sitios de muestreo ambiental y biológico.....	30
<b>Figura 7.</b> MDS de la distribución de contaminantes en tejido por especies y hábito alimenticio.....	40
<b>Figura 8.</b> Imágenes de cometas en la especie <i>Mugil cephalus</i> de la zona de Coatzacoalcos, Ver .....	45
<b>Figura 9.</b> Imágenes de cometas en la especie <i>Centropomus parallelus</i> de la zona de Coatzacoalcos, Ver .....	45
<b>Figura 10.</b> Imágenes de cometas en la especie <i>Oreochromis</i> sp de la zona de Coatzacoalcos, Ver .....	46
<b>Figura 11.</b> Imágenes de cometas en la especie <i>Ariopsis felis</i> de la zona de Coatzacoalcos, Ver .....	46
<b>Figura 12.</b> Olive tail moment y Tail length en las especies <i>Ariopsis felis</i> , <i>Centropomus parallelus</i> , <i>Mugil cephalus</i> y <i>Oreochromis</i> sp en el área de Coatzacoalcos, Ver. ....	47
<b>Figura 13.</b> Olive tail moment y Tail length en las especies evaluadas por hábito alimenticio.....	47
<b>Figura 14.</b> Modelo conceptual final del sitio con énfasis en el sistema acuático .....	51



## RESUMEN

La presente investigación se desarrolló dentro del proyecto “*Diseño y aplicación de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios contaminados de México - caso de estudio Coatzacoalcos, Veracruz*”, que tiene como objetivo principal, el diseño e implementación de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios peligrosos de México. Dentro de esta metodología se propone realizar la evaluación de riesgo de una manera integrada, tomando en cuenta un escenario humano y un escenario ecológico. El sitio que se eligió para la implementación de la metodología fue la región de Coatzacoalcos, Veracruz, la cual alberga una de las áreas industriales más grandes e importantes de México y Latinoamérica, que aunado a otras actividades productivas han desencadenado un severo impacto en los ecosistemas acuáticos de la región. El objetivo de esta investigación fue establecer e implementar una metodología para evaluar riesgo ecológico en fauna acuática de Coatzacoalcos, Veracruz. Se realizó un monitoreo ambiental de contaminantes orgánicos persistentes (COP's) en sedimentos, se evaluaron como biomarcadores de exposición los niveles de COP's en tejido muscular de cinco especies de peces y como biomarcador de efecto se evaluó el daño al ADN a través del ensayo cometa. Los compuestos detectados tanto en sedimento como en musculo fueron hexaclorobenceno (HCB),  $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -hexaclorociclohexano (HCH), diclorodifeniltricloroetano (DDT), diclorodifenildicloroetileno (DDE), mirex y bifenilos policlorados (BPC's). En sedimento exceptuando el mirex, las concentraciones de los contaminantes superaron los valores de protección establecidos, lo cual demuestra un potencial riesgo para la vida acuática de la región. El daño al ADN registrado en las especies de peces es una evidencia de la exposición a la mezcla de contaminantes genotóxicos, que aunado a la exposición a COP's refleja el grado de estrés ambiental en el que se encuentran los organismos acuáticos de la región.



## INTRODUCCIÓN

La evaluación de riesgo es un proceso utilizado para evaluar la probabilidad de que un efecto adverso ocurra por uno o varios contaminantes, tanto en receptores humanos como en ecológicos. A través del tiempo se han desarrollado metodologías para evaluar por separado el riesgo en salud (OPS, 1999) y el riesgo ecológico (USEPA, 1998; Environmental Agency-U.K., 2003).

La evaluación de riesgo ecológico (ERE) puede ser definida como un proceso utilizado para valorar de forma cualitativa y/o cuantitativa; la posibilidad de que un potencial efecto ecológico adverso ocurra o esté ocurriendo, como resultado de la exposición a uno o más factores estresantes (USEPA, 1998; Suter II, 2007; Mukhtasor *et al.*, 2004). Su propósito es contribuir a la protección y manejo del ambiente a través de la evaluación de los efectos ecológicos derivados de las actividades humanas (Suter II, 2007; Serveiss, 2002).

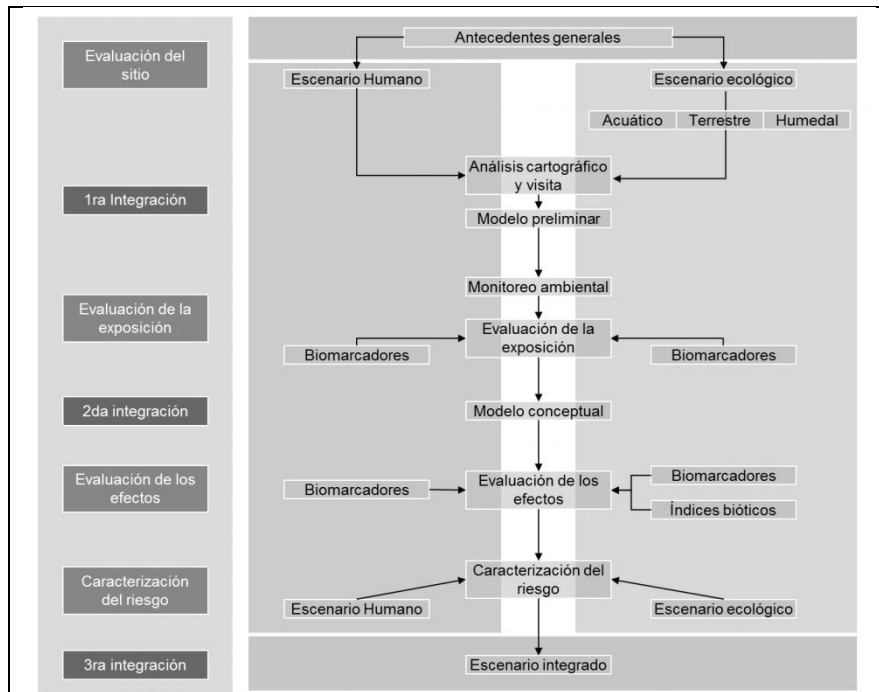
Como se mencionó el desarrollo de las metodologías de evaluación de riesgo (salud y ecológico) se ha realizado por separado; sin embargo, se ha reconocido la necesidad de establecer mejores niveles de protección tanto para el ser humano como para otros receptores ecológicos. En materia ambiental las decisiones no pueden ser completamente adecuadas si sólo se considera de forma parcial la protección de un solo receptor, ya sea humano o ecológico. En muchos casos la contaminación ambiental afecta más a los receptores ecológicos (mayor exposición o rutas) o incluso éstos resultan ser los más sensibles a los efectos negativos (Suter II, 2007; Aylward *et al.*, 1996; Ramondetta y Reposs, 1998). Estas características frecuentemente conducen a 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.

Por lo que surge la necesidad de diseñar una metodología de evaluación de riesgo integrada que contemple tanto a la población humana como a los



receptores ecológicos en un solo proceso. Que este enfocada a los escenarios reales que se presentan en un sitio contaminado, tales como la presencia de mezclas de contaminantes, diferentes compartimientos ambientales, numerosas rutas de exposición y, principalmente el impacto simultáneo sobre los diversos receptores tanto ecológicos como humanos.

La presente investigación se encuentra dentro de un proyecto mayor el cual tiene como objetivo principal, el diseño e implementación de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios peligrosos de México (Torres *et al.*, 2005). Dentro de esta metodología se propone realizar la evaluación de riesgo de una manera integrada, tomando en cuenta un escenario humano y un escenario ecológico. El esquema general (Figura 1) de la metodología consta de cuatro etapas principales (evaluación del sitio, evaluación de la exposición, evaluación de los efectos y caracterización de riesgo), además de tres etapas de integración.



**Figura 1.** Esquema general de la metodología de riesgo integrado



En la **evaluación del sitio** se describen los antecedentes generales para los escenarios humano y ecológico, a través del uso de la información geográfica, estadística, histórica y biológica disponible. Para realizar una primera integración en donde se construye un modelo preliminar, en el cuál se analizan los dos escenarios, con base en antecedentes documentales y de campo. En la **evaluación de la exposición**, se realiza un monitoreo ambiental, para determinar las concentraciones de los contaminantes presentes en el sitio, además de evaluar los biomarcadores de exposición en los diversos receptores. Con esto se realiza una segunda integración, en la que se hace una estimación del riesgo para la población humana y la biota. En la **evaluación de los efectos** se utilizan biomarcadores de efecto para ambos escenarios. Para la evaluación de los efectos en los niveles de organización biológica superiores (individuo, población y comunidad) y en los diversos sistemas (terrestre, humedal, acuático), en el escenario ecológico se toman en cuenta características generales de los individuos, parámetros poblacionales e índices bióticos para la comunidad. Finalmente se realiza la **caracterización del riesgo** en la cual se propone una integración del riesgo que permita la asignación conjunta de las magnitudes de los efectos adversos en el sitio.

El sitio que se eligió para la implementación de esta metodología fue la región de Coatzacoalcos, Veracruz, la cual está conformada por zonas urbanas, industriales, ganaderas, ribereñas y de humedales, sin embargo la principal actividad es industrial de tipo químico y petroquímico. Debido a la diversidad de ecosistemas que se identificaron en el sitio, el escenario ecológico fue dividido en ambiente terrestre, humedal y acuático. Ésta investigación sirvió para la implementación y validación de la fase de la evaluación de riesgo ecológico en el ambiente acuático, así como para establecer el riesgo ecológico en la fauna acuática de la zona de estudio.



Los ecosistemas acuáticos son de suma importancia para el desarrollo de la vida pues proporcionan el hábitat para la fauna y flora acuática, además de que son fuente de alimento y agua. Sin embargo, el rápido crecimiento poblacional aunado a un desarrollo industrial acelerado así como, a los cambios en los estilos de vida, han incrementado la presión sobre los ambientes acuáticos (Staniskiēne *et al.*, 2006; Jha, 2008).

En este contexto, los ecosistemas acuáticos son altamente vulnerables por su tendencia a acumular concentraciones relativamente mayores de contaminantes provenientes de los ecosistemas terrestres a su alrededor, así como de las entradas directas (descargas), por lo que, independientemente de su fuente de entrada al ambiente, los sistemas acuáticos son a menudo depósitos para una gran variedad de químicos. La contaminación de estos ambientes puede tener efectos negativos sobre la vida acuática (ej. alteración de la reproducción y disminución de las especies) y afectar directa o indirectamente a la salud humana y amenazar la seguridad alimentaria (Jha, 2008).

Por otra parte, los animales acuáticos son particularmente vulnerables debido a su constante exposición, derivada de vivir inmersos en el medio de exposición (aguas superficiales y profundas), a la permeabilidad de su piel y branquias y otras sensibilidades inherentes. Un ejemplo de esta sensibilidad es que peces y anfibios, son los únicos grupos vertebrados cuyos huevos carecen de una membrana amniótica y que se someten a la metamorfosis en las aguas superficiales, por lo que los estadios embrio-larvarios de estos animales son muy sensibles a los contaminantes químicos (Kendall *et al.*, 2001).

En Coatzacoalcos, Veracruz, el Río Coatzacoalcos es la principal corriente hidrológica y representa uno de los ecosistema acuático más importantes. El río tiene una extensión de 322 Km y se origina a más de 2000 m de altitud en el estado de Oaxaca. En su curso lo alimentan innumerables ríos (ej. Jaltepec, Coachapa, Uxpanapa, Calzada) y arroyos (ej. Teapa, Tepeyac, San Francisco),



contribuyendo a la descarga de contaminantes (Páez-Osuna *et al.*, 1986, Rosales-Hoz y Carranza-Edwards, 1998). Además, en las márgenes del río se encuentran instaladas un gran número de industrias; así como el complejo petroquímico más grande de Latinoamérica.

Teniendo esto en cuenta esto, el **Objetivo General** de la investigación fue:

- Establecer e implementar una metodología para evaluar riesgo ecológico en fauna acuática de Coatzacoalcos, Veracruz.

Los **objetivos específicos** fueron:

- Seleccionar los grupos animales bioindicadores para evaluar la exposición y los efectos en el sitio.
- Establecer biomarcadores de exposición y de efecto en los grupos seleccionados.
- Desarrollar los métodos de laboratorio para analizar los biomarcadores de efecto (daño genotóxico).
- Evaluar el estado general de salud de los individuos a través de biomarcador de exposición y efecto.

Cabe aclarar que el presente trabajo se encuentra organizado de acuerdo a las etapas de la metodología.

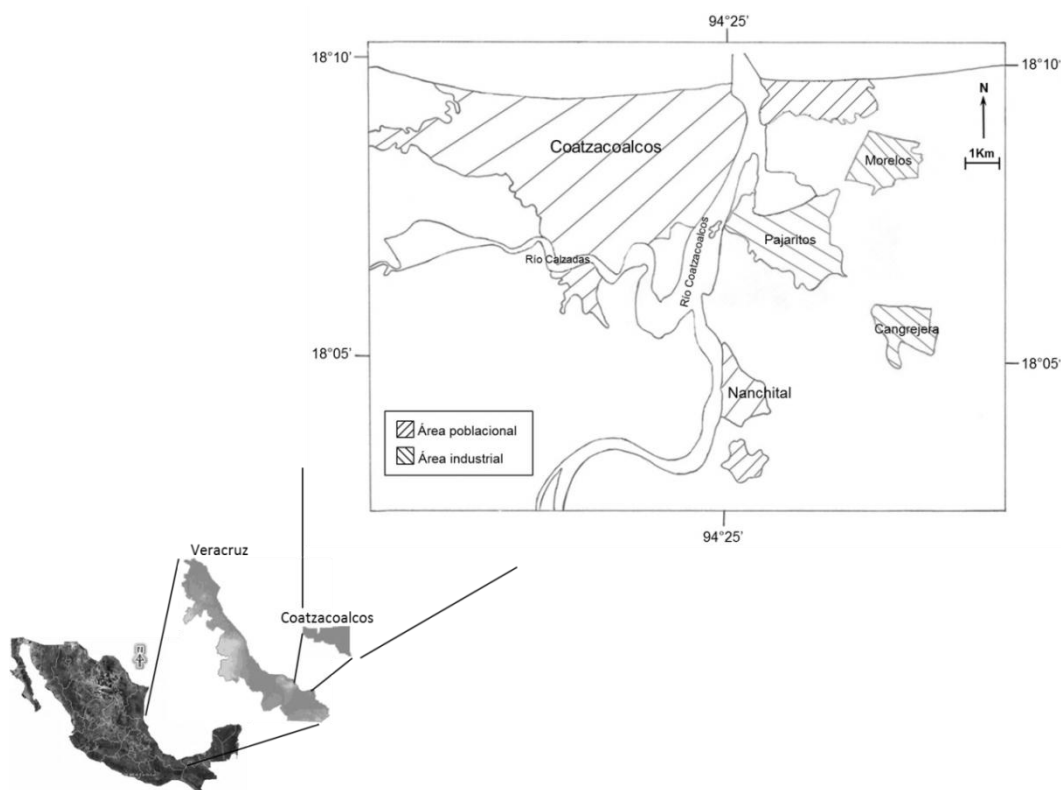


## EVALUACIÓN DEL SITIO

### Características generales del sitio

#### *Ubicación*

La zona de Coatzacoalcos se localiza al sureste del Estado de Veracruz en el municipio del mismo nombre, a  $18^{\circ} 08' 56''$  de latitud Norte y  $94^{\circ} 24' 41''$  de longitud Oeste, la altitud promedio es de 14 msnm (Figura 2). 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 llanuras costeras inundables y valles de ladera tendida (CECODES, 1988).



**Figura 2.** Localización del área de estudio en la región de Coatzacoalcos, Veracruz





### *Clima*

El clima predominante es tropical lluvioso [Am (i') gw"], con temperatura media del mes más frío mayor de 18°C. 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 (García, 2004).

### *Hidrología*

El río Coatzacoalcos, el cual tiene una extensión 322 Km es la principal corriente superficial. La intrusión salina en el río varía de acuerdo con la época del año, en temporada de lluvias es de 3 Km, en época de nortes llega a ser de 22 Km y en época de estiaje llega 45.5 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:

Gleysoles: suelos ricos en materia orgánica formados por la condición de inundación, tienen un drenaje deficiente y son muy plásticos y chiclosos. Con abundante vegetación típica de esas condiciones de humedad. Yacen sobre roca caliza suave y pueden ser arcillosos a través del perfil de colores grisáceo y otros amarillentos, ocasionalmente con manchas.

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.

### *Vegetación*

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).

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, 1978).

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, 1978).

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, 1978).

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, 1978).

Vegetación de dunas costeras: se desarrolla sobre suelos con exceso de sales (solonchak). 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, 1978).

### *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: 36 anfibios, 103 reptiles, 426 aves y 91 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).

Bozada y Páez (1986) reportan en estudios previos que se ha encontrado en el sistema un total de 46 especies de peces y 13 invertebrados (9 crustáceos y 4 moluscos). Es importante mencionar que los sistemas lagunares y en especial los manglares, son refugio y zonas de reproducción de decenas de especies de peces y de crustáceos de valor comercial, por lo que son parte importante de la economía de algunas de las comunidades aledañas a estas zonas.



## **Actividades productivas en la zona de estudio**

### *Industrial*

En el municipio de Coatzacoalcos se han establecido diversas industrias entre las que se encuentran 39 microempresas, 21 de las cuales fabrican productos con calidad de exportación. Destacan la industria petroquímica secundaria, la fabricación de químicos y de polietileno. En la zona se encuentra además la industria PEMEX Petroquímica que es la encargada de la elaboración, el almacenamiento, la distribución y la comercialización de todos los productos petroquímicos secundarios. PEMEX Petroquímica cuenta con 60 diferentes plantas productoras en el país pero el 85% de sus productos son elaborados en la zona de Coatzacoalcos, en los parques industriales de Cosoleacaque, Cangrejera, Morelos y Pajaritos. Asimismo, en la zona están instaladas varias industrias relacionadas con procesos químicos (Cuadro 1).

### *Agrícola*

El municipio cuenta con una superficie total de 13,400.77 hectáreas, de las cuales se siembran 7,022.72. Los principales productos agrícolas que se cosechan son: maíz, frijol y arroz. Existen 306 unidades de producción rural con actividad forestal de las que 85 están dedicadas a productos maderables (INEGI, 2008).

### *Ganadera*

Una superficie de 9,422 hectáreas está dedicada a la ganadería en donde se ubican 448 unidades de producción rural con actividad de cría y explotación de animales. Se cuenta con 28,455 cabezas de ganado bovino de doble propósito (carne y leche), además de la cría de ganado porcino (6,283 cabezas), ovino (3,876 cabezas) y equino (INEGI, 2008).



### Turismo y Servicios

En el municipio existen, al 31 de diciembre de 1996, 44 establecimientos de hospedaje que ofrecen un total de 1,674 habitaciones disponibles. Se brindan servicios de 41 hoteles, 3 moteles, 180 restaurantes, 2 agencias de viajes y 13 arrendadoras (INEGI, 2008).

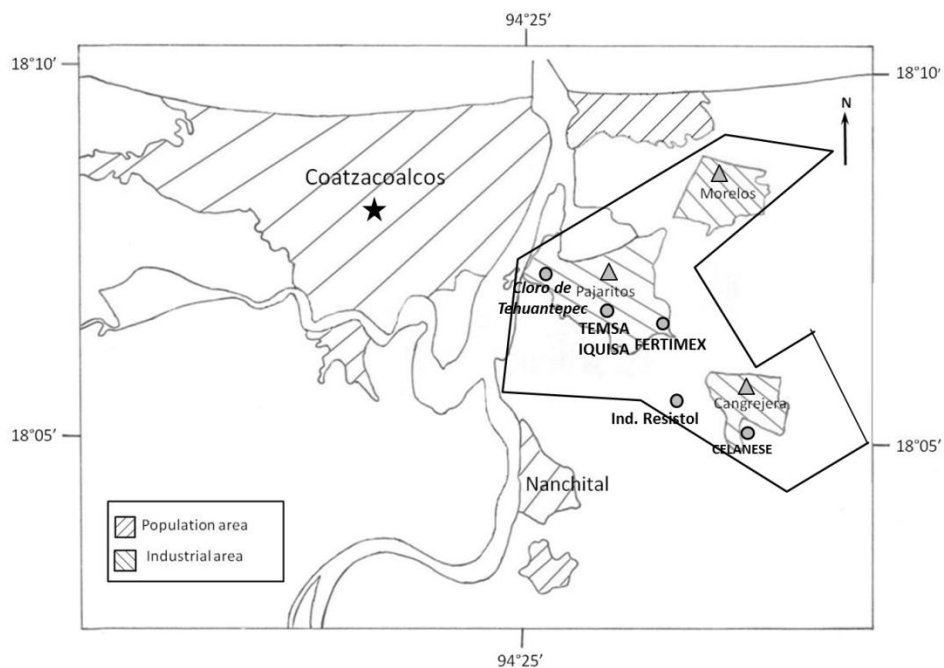
**Cuadro 1.** Empresas localizadas en la zona de Coatzacoalcos, Ver.

Empresas	Giro industrial	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 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: Sánchez, 1994.

### Problemática del sitio

El área industrial de Coatzacoalcos alberga los complejos petroquímicos más grandes e importantes de México y Latinoamérica; su producción en conjunto es de aproximadamente 1.6 miles de millones de toneladas/año de productos petroquímicos (Morales *et al.*, 2006). Desde su establecimiento en los 60's el estuario de Coatzacoalcos ha experimentado un rápido desarrollo industrial y un crecimiento poblacional acelerado, que aunado a otras actividades productivas como la agricultura y ganadería han desencadenado un severo impacto en los ecosistemas de la región, el cual se ha acentuado en las últimas décadas (Bozada y Bejarano, 2006). En la (Figura 3) se muestra la ubicación de la zona industrial en relación con la ciudad de Coatzacoalcos y los principales poblados, así como la localización de las empresas mencionadas en el Cuadro 1.



**Figura 3.** Localización del área industrial en la región de Coatzacoalcos, Ver. Estrella: ciudad de Coatzacoalcos; triángulo: Complejo PEMEX; círculo: industria privada



Debido a la constante actividad industrial en la zona (principalmente petroquímica), la cuenca baja del Río Coatzacoalcos es considerada como uno de los sitios más contaminados de México (Páez-Osuna *et al.*, 1986; Botello y Páez, 1987; Bozada y Namihira, 2005; Rosales y Carranza, 2005; Espinosa-Reyes *et al.*, 2010).

De acuerdo con Bozada y Páez (1986), el estuario del Río Coatzacoalcos está sujeto a innumerables impactos ambientales derivados principalmente del vertido de desechos industriales de los complejos petroquímicos y factorías químicas de la zona; del tráfico de buques petroleros en los puertos de Coatzacoalcos y Minatitlán, con escapes de los oleoductos durante la carga o descarga y con posibles accidentes en los barcos; de los residuos, la combustión y la lubricación de los barcos mercantes del sistema multimodal de carga del puerto de Coatzacoalcos; de la utilización del río como receptor de las descargas municipales de las ciudades de Coatzacoalcos y Minatitlán. Por otra parte Albert *et al.*, (2005) mencionan que el constante dragado del estuario ha producido cambios en el régimen de las corrientes, la circulación y la salinidad, igualmente señala que se ha generado un aumento en la turbidez del río y una re-suspensión en la columna de agua de los contaminantes que se encuentran depositados y asociados a los sedimentos.

Estudios ambientales en el área han registrado la presencia de hidrocarburos (Botello y Páez, 1986; Celis *et al.*, 1987; Farrán *et al.*, 1987; Albert *et al.*, 2005; Ponce y Botello, 2005), compuestos orgánicos volátiles (Stringer *et al.*, 2001), metales pesados (Rosales-Hoz y Carranza-Edwards, 1998; Stringer *et al.*, 2001; Bahena-Manjarrez *et al.*, 2002; Bozada y Namihira, 2005; Rosales y Carranza, 2005) y contaminantes orgánicos persistentes [COP's] (Botello y Páez 1987; Espinosa-Reyes *et al.*, 2010). Estos contaminantes han sido registrados en suelo, sedimento y agua (Cuadro 2).



**Cuadro 2.** Principales contaminantes reportados en el ambiente en la zona de Coatzacoalcos

Contaminantes	Matriz	Referencia
METALES PESADOS: As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, V y Zn.	Suelo Sedimento	Stringer <i>et al.</i> , 2001 Bozada y Namihira, 2005 Rosales y Carranza, 2005 Botello y Páez, 1986
HIDROCARBUROS: Hidrocarburos totales del petróleo (HTP's). Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's).	Agua Sedimento	Botello y Páez, 1986 Celis <i>et al.</i> , 1987 Albert <i>et al.</i> , 2005 Ponce y Botello, 2005
COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (COV's): Cloroformo, dicloroetano, tricloroetano, tetracloroetano, cloruro de vinilo y tetracloruro de carbono.	Agua Sedimento	Stringer <i>et al.</i> , 2001
COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES (COP's): hexaclorobenceno, aldrín, endrín, heptacloro y lindano.	Sedimento	Botello y Páez, 1986

#### *Estudios en fauna acuática de la zona*

La presencia de estos contaminantes ha motivado la realización de estudios para determinar las concentraciones de los mismos en la fauna acuática de la zona. En estos estudios se han detectado principalmente metales pesados (Cu, Ni y Zn en diferentes especies de peces y crustáceos) e hidrocarburos (HTP's y HAP's en crustáceos y bivalvos) (Cuadro 3).





**Cuadro 3.** Contaminantes detectados en especies acuáticas de la zona de Coatzacoalcos, Veracruz

	Grupo	Especie	Localidad	Concentración (µg/g)	Referencia
	Bivalvos	<i>Crassostrea virginica</i>	Laguna del Ostión	Cu: 38 Ni: 84 Zn: 1440	Villanueva <i>et al.</i> , 1988
Metales	Peces	<i>Cichlasoma mecki</i>	Río Coatzacoalcos	Cu <1, Zn 14-17	Botello <i>et al.</i> , 1987
		<i>C. fenestratum</i>		Cu <1, Zn 2.4-16	
		<i>Eugarres plumerri</i>		Cu 5, Zn 60	
		<i>Conodon nubilis</i>		Cu <1, Zn 1.7-18	
		<i>Tarpon atlanticus</i>		Cu <1, Zn 19	
		<i>Mugil curema</i>		Cu <1, Zn 14	
	Crustáceos	<i>Callinectes bocourti</i>	Río Coatzacoalcos	Cu 30 Zn 66	
HTP's	Peces	<i>Mugil curema</i>	Isla Pajaritos	1.56	Botello y Páez, 1986
		<i>Tarpon atlanticus</i>	Río Calzadas	1.47	
	Crustáceos	<i>Callinectes bocourti</i>	Río Coatzacoalcos	0.90	Botello <i>et al.</i> , 1987
HAP's	Peces	<i>Mugil curema</i>	Isla Pajaritos	0.04	Botello y Páez, 1986
		<i>Tarpon atlanticus</i>	Río Calzadas	0.40	
	Crustáceos	<i>Callinectes bocourti</i>	Río Coatzacoalcos	0.02	
	Bivalvos	<i>Rangia flexuosa</i>	Río Coatzacoalcos	0.12	Botello <i>et al.</i> , 1987
		<i>Polymesoda caroliniana</i>	Isla Pajaritos	0.13	

### Análisis cartográfico y observaciones de campo

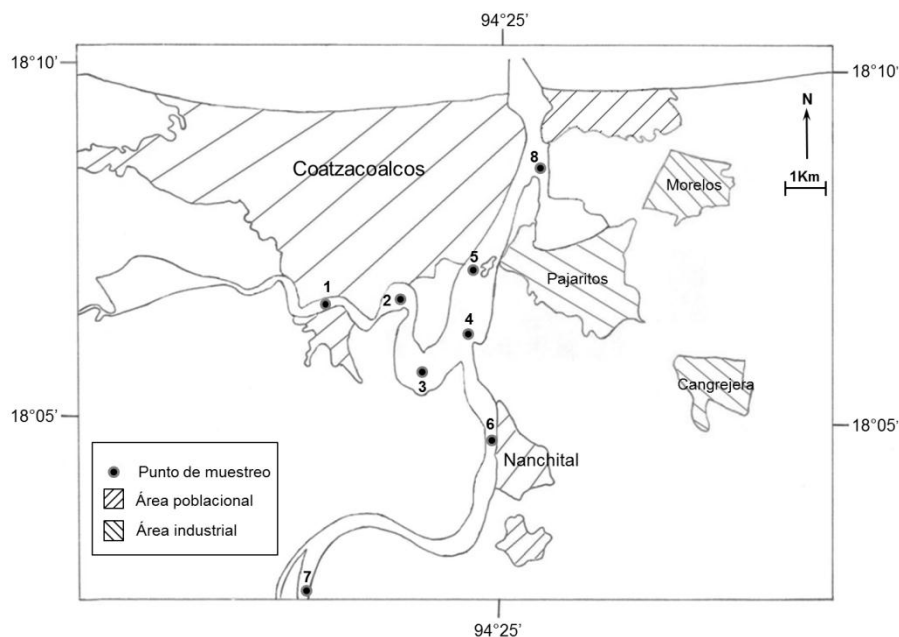
De acuerdo con los autores de los estudios previos realizados en la zona de estudio (Cuadro 2) la presencia de agentes tóxicos están principalmente asociadas con la actividad industrial y con los diversos accidentes ocurridos asociados a ésta. Tomando en cuenta esto y la distribución de los principales ecosistemas de la región, se diseñaron recorridos de campo para el reconocimiento de las actividades antrópicas y el estado de conservación de los ecosistemas; así como, para identificar los posibles puntos de muestreo. Los recorridos establecidos fueron: 1) la zona de complejos industriales, 2) la zona urbana aledaña a los complejos industriales y; 3) el sistema ribereño y de humedales. Estos recorridos fueron llevados a cabo en enero de 2006.



### Selección de sitios de muestreo

Para la selección de los sitios de muestreo se tomó en cuenta la dirección de los vientos, la localización de los complejos industriales como fuentes puntuales o fijas de contaminantes, la ubicación de las zonas urbanas y la influencia de los sistemas ribereños. Igualmente se consideraron sitios donde posiblemente se tenga el impacto de fuentes no puntuales como escurrimientos urbanos, agrícolas y/o ganaderos, además se consideraron posibles sitios no impactados y los estudios previos que se tenían en cuanto a concentraciones de contaminantes en la zona.

En la visita de reconocimiento se seleccionaron 11 puntos de muestreo (Figura 4 y Cuadro 4) a lo largo de los Ríos Coatzacoalcos y Calzadas, además se consideró una posible zona de referencia (Laguna del Ostión), la cual se encuentra localizada al este de la ciudad de Coatzacoalcos.



**Figura 4.** Localización de los sitios del muestreo seleccionados en la visita de reconocimiento. Los sitios 9-11 (no mostrados en el mapa) se localizan en la Laguna del Ostión. Los nombres de los sitios se enlistan en el Cuadro 4



**Cuadro 4.** Sitios del muestreo preliminar en Coatzacoalcos, Veracruz

<b>Número de sitio</b>	<b>Nombre del sitio</b>	<b>Coordenadas</b>
1	Estero del Pantano	18° 06'11.2" 94° 27'35.6"
2	Terranova	18° 06'06.7" 94° 26'40.6"
3	Intersección entre los Ríos Calzadas y Coatzacoalcos	18° 05'19.8" 94° 25'35.7"
4	Punta brava	18° 05'21.4" 94° 25'08.8"
5	Ixhuatlán	18° 02'54.1" 94° 25'23.7"
6	Isla Copalapa	18° 06'57.4" 94° 25'10.3"
7	Puente Coatzacoalcos II	18° 00'53.3" 94° 26'55.7"
8	Entrada a la laguna de Pajaritos	18° 08'42.8" 94° 24'18.1"
9	Laguna del Ostión	18° 12'27.3" 94° 37'29.2"
10	Laguna del Ostión 2	18° 11'59.6" 94° 38'06.2"
11	Brazo Huazuntlán	18° 09'57.3" 94° 37'58.8"



### *Monitoreo ambiental preliminar*

Una vez efectuado el recorrido de reconocimiento y la selección de los sitios se realizó un monitoreo preliminar con la finalidad de establecer el diseño de muestreo (gradiente de contaminación o sitio de referencia) y seleccionar los contaminantes críticos de la zona. Se eligió evaluar las concentraciones de metales pesados, metaloides y COP's en sedimento. Esta primera selección de contaminantes se hizo con base a la presencia de los mismos en los diferentes compartimentos ambientales y a las concentraciones reportadas en los estudios previos. En cada uno de los sitios (Figura 4) se recolectaron muestras de sedimento, en las cuales se cuantificaron metales pesados y metaloides (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, V, Zn) y COP's [ $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -hexaclorociclohexano (HCH), hexaclorobenceno (HCB), aldrin, dieldrin, mirex,  $\alpha$ -,  $\gamma$ - clordano, oxiclordano, trans-,cis-nonaclor, epóxido de heptacloro, p,p'-DDT, p,p'-DDE y 41 congéneres de BPC'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) ].

En los Cuadro 5 y Cuadro 6 se muestran las concentraciones de metales y COP's en sedimento registradas en el monitoreo preliminar. Considerando los niveles de protección para vida acuática establecidos por la Canadian Sediment Quality Guidelines (CSQG) y/o por el National Oceanic and Atmospheric Administration (SQuiRT-NOAA) para sedimento no se registraron concentraciones elevadas de metales en las muestras recolectadas. No así para el caso de los COP's en donde a excepción del mirex todos los compuestos sobrepasan los niveles establecidos por las guías.



**Cuadro 5.** Concentraciones de metales (mg/Kg) en sedimento obtenidas en el muestro preliminar del área de estudio

Elemento	Mediana	Rango	Valor de Referencia <sup>a</sup>
As	6.5	<2-10	5.9
Cd	<0.5	---	0.6
Cr	11.0	9-37	37.3
Cu	8.5	3-19	35.7
Hg	0.04	0.01-0.09	0.17
Ni	6.0	5-138	NR
Pb	9.5	3-22	35
V	18.0	14-45	SR
Zn	47.5	24-62	123.0

DE: desviación estándar, SR: sin valor de referencia.

<sup>a</sup>CSQG (Canadian Sediment Quality Guidelines for the protection of aquatic life).

**Cuadro 6.** Concentraciones de COP's (ng/g) en sedimento obtenidas en el muestro preliminar del área de estudio

	Mediana	Rango	Valor de referencia
HCB	196.4	34.4-1299.2	20 <sup>a</sup>
α-HCH	504.5	112.8-780.5	6 <sup>a</sup>
β-HCH	48.2	N.D.-80.0	5 <sup>a</sup>
γ-HCH	84.5	2.3-124.4	0.94 <sup>b</sup>
p,p'-DDT	44.9	N.D.-82.7	1.42 <sup>b</sup>
p,p'-DDE	6.0	N.D.-19.1	1.19 <sup>b</sup>
Mirex	3.1	---	7 <sup>a</sup>
Σ BPC's	532.4	N.D-8337.2	34.1 <sup>b</sup>

DE: desviación estándar, SR: sin valor de referencia.

<sup>a</sup>NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration- Screening quick).

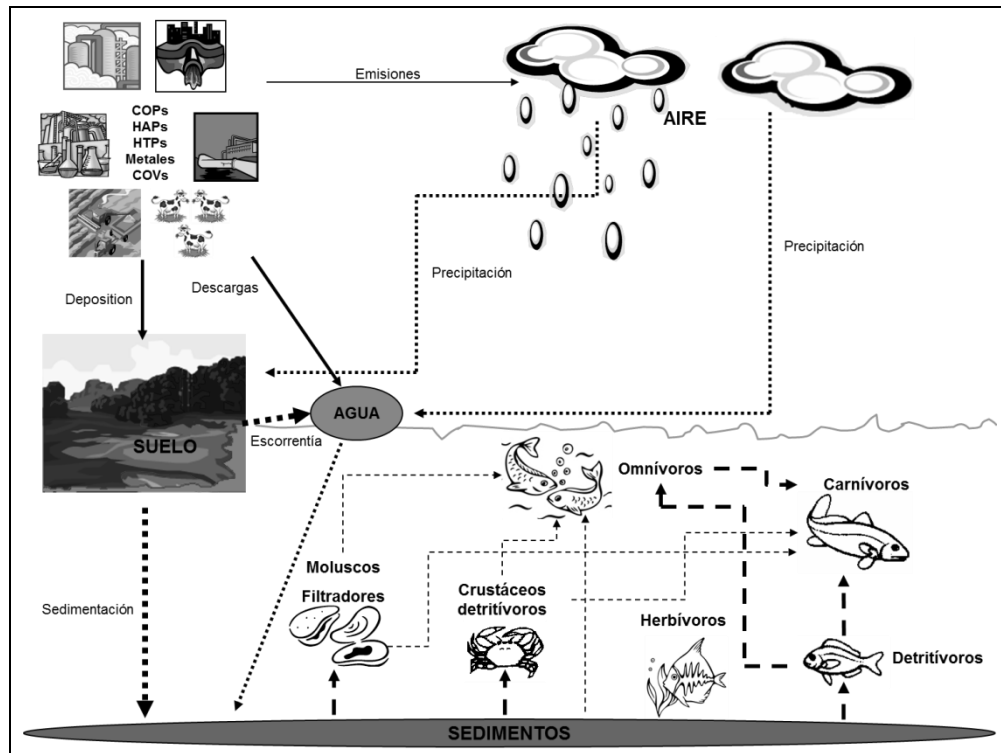
<sup>b</sup>CSQG (Canadian sediment Quality Guidelines for the protection of aquatic life).

<sup>c</sup>El valor del mirex no presenta desviación estándar o rango porque fue detectada en una sola muestra.



### *Modelo preliminar del sitio*

Considerando la información obtenida del sitio (características generales, actividades industriales, estudios previos, etc.) se realizó un modelo conceptual preliminar del sitio enfocándose principalmente en el sistema acuático (Figura 5), en el cual se consideran como las principales fuentes de contaminantes (tanto puntuales como no puntuales) las descargas industriales y municipales, los escurrimientos agrícolas y/o ganaderos y los derrames; así como las emisiones a la atmosfera de las diferentes industrias en la zona. Considerando algunas características fisicoquímicas (ej. presión de vapor, constante de la ley de Henry, coeficiente de adsorción ( $K_{oc}$ ); coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ) y solubilidad en agua) de los contaminantes reportados, se espera que a partir de estas fuentes se da una dispersión por volatilización, precipitación, escorrentías y/o sedimentación (dependiendo de la fuente) hacia los diferentes compartimentos ambientales (suelo, aire, agua y sedimento)(ATSDR 1995, 2000, 2002a, 2002b, 2005). Una vez en ello se espera se dé una transferencia a la biota. En este modelo únicamente se consideró a la macrofauna (peces, crustáceos y bivalvos) del sistema. Las líneas solidas (—) representan el paso de los contaminantes de las fuentes (industria, agricultura, ganadería, derrames, etc.) hacia los compartimentos ambientales. Las líneas punteadas (.....) representan el movimiento de los contaminantes a través de los compartimentos ambientales y las líneas con guión (- -) muestran el movimiento de los contaminantes en las cadenas tróficas. Aquellos movimientos que se consideraron como los más importantes están representados con líneas más gruesas.



**Figura 5.** Modelo conceptual preliminar del sitio con énfasis en el sistema acuático

### *Diseño de muestreo*

Como se mencionó la Laguna del Ostión fue seleccionada como una posible zona de referencia, sin embargo las concentraciones de metales encontradas en las muestras fueron superiores que las encontradas en las muestras de la zona de Coatzacoalcos (Cuadro 7). En cuanto a los COP's fueron registradas concentraciones de HCB,  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, p,p'-DDT y p,p'-DDE. Únicamente las concentraciones de  $\beta$ -HCH (57.8 ng/g) y DDT (50.7 ng/g) fueron mayores que en los sitios de Coatzacoalcos. Algunos autores han asociado la contaminación de esta laguna a la actividad petrolera del Golfo de México, debido a que las diversas corrientes del mismo transportan los contaminantes generados en las zonas petroleras hasta los estuarios y lagunas costeras del Golfo.



Debido a estos resultados esta zona fue descartada como posible sitio de referencia, por lo que el diseño de muestreo elegido para el estudio fue el de gradiente de contaminación a partir de la fuente de contaminación. Sin embargo, como se verá más adelante con los resultados obtenidos del monitoreo ambiental no se pudo establecer gradiente.

**Cuadro 7.** Concentraciones de metales (mg/Kg) en sedimento de Laguna del Ostión obtenidas en el muestro preliminar del área de estudio

<b>Elemento</b>	<b>Mediana</b>	<b>Rango</b>
As	7.0	<5-7
Cd	<0.5	---
Cr	73.0	24-93
Cu	43.0	12-52
Hg	0.1	0.03-0.09
Ni	37.0	16-42
Pb	5.0	4-7
V	122.0	35-169
Zn	72.0	34-100

#### *Contaminantes prioritarios*

Se consideran contaminantes prioritarios aquellos que realmente representan un riesgo para el sitio en estudio. Entre los factores que se tomaron en cuenta para la selección fueron: la comparación ente las concentraciones ambientales y los valores de referencia (en este caso la CSQG y/o la SQuiRT-NOAA, valores basales, etc.); frecuencia de localización en los puntos de exposición; persistencia ambiental; presencia del contaminante en todos los compartimentos ambientales y por sus características toxicológicas.

Con base en estos criterios y con los resultados del monitoreo ambiental preliminar se eligieron como contaminantes prioritarios a los COP's, puesto que las concentraciones de metales encontradas no fueron significativas, además se





consideró que por sus características fisicoquímicas y toxicológicas eran de mayor prioridad.

Los compuestos orgánicos persistentes son contaminantes con diferentes grados de degradación fotoquímica, química y bioquímica, por lo que su persistencia en el ambiente es elevada. Se encuentran escasamente de forma natural en el ambiente y la gran mayoría son de origen antropógeno. Su persistencia se la dan características fisicoquímicas como la baja polaridad y la estabilidad de los enlaces carbono-halógeno, lo que los convierte en poco reactivos y resistentes a la degradación biológica y fotoquímica. Otras propiedades fisicoquímicas que determinan su comportamiento en el ambiente son la solubilidad en agua, la presión de vapor, la constante de la ley de Henry (H), el coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ) y el coeficiente de partición carbono orgánico-agua ( $K_{oc}$ ) (Albert, 2004). En el Anexo 1 se describen de forma general cada una de estas propiedades fisicoquímicas y se muestran los valores de cada una de ellas para los COP's registrados en la zona.

Los COP's pueden entrar en los ambientes acuáticos por una gran variedad de fuentes incluyendo la atmosfera, industria y descargas municipales, y por otras fuentes no puntuales como los escurrimientos de agricultura, ganadería y áreas urbanas. Estos contaminantes tienen baja solubilidad, están asociados con partículas y son a menudo transportados a través de erosión del suelo y superficies de escurrimiento. Han sido comúnmente asociados a los sedimentos y son transportados a través de las cadenas tróficas vía plantas bentónicas, invertebrados y peces que a su vez pueden ser comidos por aves, peces e incluso el hombre (Braser y Wolff, 2004). Debido a su alta lipofilidad y persistencia tienden a acumularse en tejido graso y a biomagnificarse a través de las cadenas tróficas (Walker, 2009). Estos contaminantes se han relacionado con efectos y/o daños morfológicos, bioquímicos y fisiológicos, neurológicos, inmunológicos,



reproductivos y genotóxicos en biota y población humana, razones por las que han sido prohibidos o restringidos en numerosos países (Buccini, 2003). En México, los COP's han sido prohibidos o restringidos desde 1991, sin embargo existen pocos estudios que demuestren su presencia y bioacumulación, así como sus efectos en los ecosistemas mexicanos (Botello *et al.*, 2000; Trejo-Acevedo *et al.*, 2009; Espinosa-Reyes *et al.*, 2010).

### *Selección de especies*

Para realizar la selección de especies se establecieron los siguientes criterios:

- Que sean **especies críticas**; es decir, a especies que cumplan con una función específica dentro del ecosistema, que sean de importancia económica, cultural, científica y/o que presenten algún estatus de protección de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2001.
- Comportamiento químico de los **contaminantes**; el cual nos ayudará a determinar las rutas de exposición y así como los probables receptores biológicos.
- Se deben tomar en cuenta las posibles **rutas de exposición** (sedimento y agua), para seleccionar aquellas especies que se encuentran mayormente expuestas.
- Que sean especies de **biología conocida** (dieta, amplitud de hábitat, hábitos de conducta, longevidad, fisiología, etc.)
- Que sean de **fácil captura y manejo**.
- Especies que se encuentren en **diferentes niveles tróficos**, para garantizar una mayor relevancia ecológica y una mejor caracterización del riesgo.



De acuerdo con los criterios descritos los grupos propuestos para evaluar en el sistema acuático fueron los peces. Cabe mencionar que todas las especies seleccionadas en la zona para la evaluación de los biomarcadores de exposición y efectos son consumidas por los pobladores locales, por lo que presentan una importancia tanto alimenticia como económica. Así también estas especies son de hábitos alimenticios diversos por lo que se encuentran en diferentes niveles tróficos lo que se garantiza una representatividad de las especies de la zona.

Los peces son comúnmente usados para el biomonitoreo de contaminantes ya que son los vertebrados acuáticos que bioacumulan sustancias tóxicas, más ampliamente distribuidos, aunado a la diversidad e importancia que tienen en estos ambientes. Se ha visto que responden con gran sensibilidad a cambios en el ambiente acuático y a las bajas concentraciones de contaminantes ambientales, (Russo *et al.*, 2004; Klobučar *et al.*, 2010). Los peces por otra parte ocupan una posición fundamental en el campo de la toxicología, debido a que han sido ampliamente empleados en estudios concernientes a salud humana y ecológica.

El estudio de los peces incluye una amplia variedad de enfoques para la detección de los impactos de la contaminación acuática a partir de medidas directas de la mortalidad, al análisis de la dinámica demográfica y la estructura de la comunidad, a la detección de medidas de cambios subcelulares (Di Giulio y Hinton, 2008).

Por otra parte, la distribución espacial de contaminantes en sedimentos y biota en los ecosistemas han sido relacionadas con una gran variedad de respuestas biológicas en las poblaciones y comunidades de peces, con el objeto de determinar una posible relación entre los contaminantes en el ambiente y la salud de los peces (Adams *et al.*, 1999).

Los efectos en peces son el resultado de una serie de acontecimientos relacionados con diferentes características físicas, químicas y procesos biológicos. Los contaminantes son liberados al ambiente a partir de diversas fuentes; se



incorporan a los sistemas acuáticos en los efluentes, la deposición atmosférica, la escorrentía y aguas subterráneas, y se distribuyen a lo largo de la columna de agua y los sedimentos. El alimento de los peces se contamina a través del contacto con agua o sedimento y/o a través de sus propios alimentos. Los peces acumulan estos contaminantes, tanto por la ingestión de este alimento contaminado y por el contacto directo con el agua y sedimento contaminados. Los contaminantes acumulados pueden ser distribuidos en todo el pez y algunos de ellos llegan a un lugar de acción para provocar efectos tóxicos en otros organismos incluido el hombre (Erickson *et al.*, 2008).

Como ya se ha mencionado, la exposición de los organismos vivos a contaminantes ambientales puede resultar en alteraciones bioquímicas, fisiológicas e histológicas. La presencia de estas alteraciones puede servir como un biomarcador, los cuales son parámetros biológicos en componentes o procesos, estructuras o funciones celulares o bioquímicas, que reflejan un cambio en la condición o salud de un organismo o población como resultado de la exposición a un agente estresante, y que son susceptible de medición (Shugart, 2000; Chambers *et al.*, 2002 Werner *et al.*, 2003).

Se pueden tener *biomarcadores de exposición* los cuales nos indican que un organismo o población ha experimentado exposición a un contaminante o a otro agente estresante. Sin embargo los cambios en estos biomarcadores no están necesariamente relacionados directamente a el mecanismo específico de acción de él toxico y podrían no ser predictivos del grado de efecto adverso en el organismo o población. Están también los *biomarcadores de efecto* que son alteraciones en el organismo, que dependiendo de su magnitud pueden relacionarse con un efecto. Estos pueden estar específicamente asociados con el mecanismo de acción del contaminante. Por último se tienen los *biomarcadores de susceptibilidad* los cuales indican el deterioro del estado fisiológico o bioquímico que puede predisponer al individuo a impactos de agentes químicos, físicos o infecciosos (Chambers *et al.*, 2002).



Estos biomarcadores pueden ser herramientas útiles para entender la compleja interacción entre la respuesta de los organismos a estresores ambientales y sus efectos subletales en la salud del organismo (Werner *et al.*, 2003).

### *Selección de biomarcadores*

#### *Biomarcadores de Exposición*

Tomando en cuenta que se consideraron a los COP's como los contaminantes críticos, para realizar la evaluación de los biomarcadores de exposición se cuantificaron las concentraciones de COP's en tejido muscular

#### *Biomarcadores de Efecto*

Compuestos genotóxicos como As, Cd, HAP's, DDT, DDE y lindano han sido detectados en la región de Coatzacoalcos. Por lo tanto, se decidió evaluar el daño genotóxico a través del ensayo cometa, el cual consideramos como un biomarcador integral para evaluar los efectos a la mezcla de contaminantes en los peces de la región.

Cambios estructurales en la integridad del ADN causada por agentes que dañan el ADN son herramientas útiles para evaluar exposición a contaminantes ambientales peligrosos para la salud humana y de la biota (Shugart y Theodorakis, 1998).

Algunos contaminantes ambientales pueden afectar el material genético de las especies de vida silvestre, por lo que diversos mecanismos y métodos se han desarrollado para evaluar la exposición y detectar el daño al ADN (Nacci *et al.*,

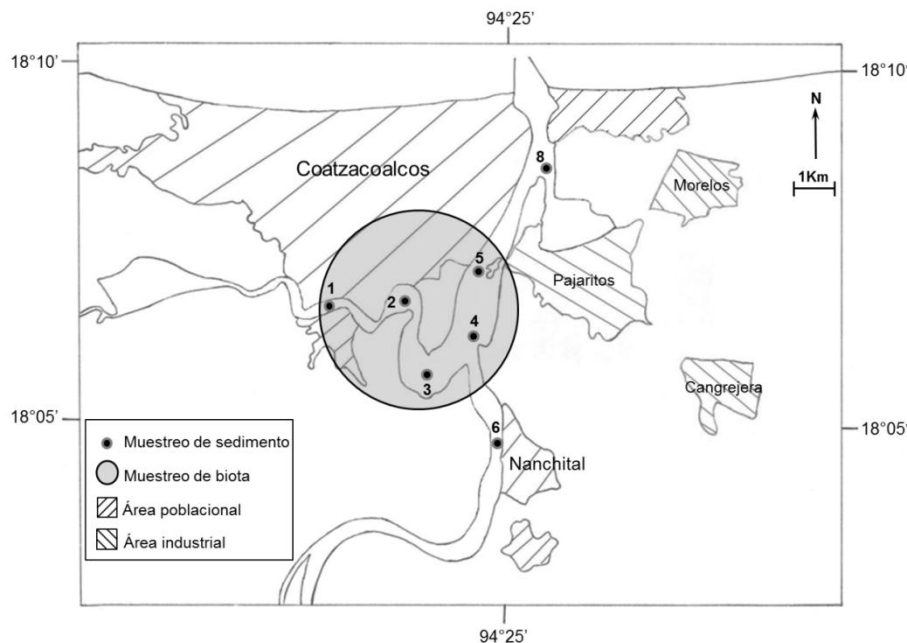


1996). El ensayo del cometa es un método genotoxicológico sensible de evaluación de daño al ADN en células individuales, que permite la cuantificación de roturas en el ADN y sitios álcali- lábiles (Tice *et al.*, 2000; Christofolletti *et al.*, 2009). Recientemente el ensayo cometa ha ganado una gran aceptación como herramienta fundamental en estudios de genotoxicidad y biomonitoreo debido a su sensibilidad para detectar niveles bajos de daño al ADN, fácil y rápida aplicación, reproducibilidad, flexibilidad, bajo costo y corto tiempo para llevarlo a cabo (Shugart, 2000; Tice *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2008). El ensayo cometa ha sido ampliamente utilizado en diversas especies de peces de diferentes ambientes acuáticos y ha sido estandarizado para su aplicación en diferentes tejidos (sangre, hígado y branquias), para el estudio de la exposición a una gran variedad de compuestos genotóxicos (Lee y Steinert, 2003; Dhawan *et al.*, 2009).

### **Monitoreo ambiental**

Una vez que se establecieron los sitios de muestreo, los contaminantes críticos, los biomarcadores de exposición y de efecto y, seleccionado el grupo de organismos bioindicadores, se llevó a cabo el monitoreo ambiental en octubre de 2006.

Se recolectaron muestras de sedimento superficial en siete sitios de muestreo (Figura 6). El sedimento fue tomado directamente del fondo ( $\approx 1.5-2$  m) en un frasco de vidrio ámbar [previamente lavado con una solución de  $K_2Cr_2O_2+H_2SO_4+H_2O$  (mezcla crómica)] dejando un poco de agua en la superficie de la muestra y se almacenaron a  $4^\circ C$  hasta su análisis.



**Figura 6.** Localización de sitios de muestreo ambiental y biológico

En las muestras de sedimento se realizó la cuantificación de las concentraciones de  $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - HCH, HCB, aldrin, dieldrin, mirex,  $\alpha$ -,  $\gamma$ - clordano, oxiclordano, trans-,cis-nonaclor, epóxido de heptacloro, p,p'-DDT, p,p'-DDE y 41 congéneres de BPC'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).

Las muestras fueron extraídas de acuerdo con los métodos 8081A y 8270C de la USEPA (1996a, b) con ligeras modificaciones. Brevemente, las muestras de sedimento (1g) se extrajeron con horno de microondas en 14 mL de diclorometano. Después de la extracción las muestras se evaporaron a un volumen de 0.2 mL con una corriente de nitrógeno en un evaporador a 37°C; posteriormente estas se re-suspendieron a 2 mL con hexano. Finalmente, este volumen fue transferido a una columna de fluorisil con 6% de dietiléter en hexano. El extracto fue concentrado a 1.0 mL con una corriente de nitrógeno. El endrin-C<sup>13</sup>



y el PCB 14-C<sup>13</sup> 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 Sediment Blended for Toxic Organics) del National Water Research Institute de Canadá. Una vez realizada la extracción, 1µL del extracto fue inyectado en un cromatógrafo de gases (HP 6890) acoplado a un espectrofotómetro de masas de acuerdo con el método reportado por Trejo-Acevedo *et al.*, (2009). El límite de detección fue de 0.6 a 2 µg/L para sedimento (Ver Anexo 2 para método detallado). Las concentraciones de COP's en sedimentos se reportan en ng/g peso seco.

De los 57 compuestos evaluados se detectaron 27 (HCB, α, β, γ-HCH, p,p'-DDT, p,p'-DDE, mirex y 20 congéneres de BPC's) en la zona de estudio (Cuadro 8). Los congéneres de BPCs detectados fueron 52, 70, 74, 82, 87, 99, 101, 105, 110, 118, 128, 132, 138, 149, 151, 153, 156, 158, 170, 180. Exceptuando el mirex, las concentraciones de los contaminantes registrados en las muestras superaron los valores de protección ambiental establecidos por las guías internacionales [(CSQG) y (NOAA)].

**Cuadro 8.** Concentraciones of COP's (ng/g) en sedimento del área evaluada

	<b>Mediana</b>	<b>Rango</b>	<b>Valor de referencia</b>
HCB	179.0	(33.4-756.6)	20 <sup>a</sup>
α-HCH	281.8	(237.9-643.8)	6 <sup>a</sup>
β-HCH	37.6	(33.1-65.0)	5 <sup>a</sup>
γ-HCH	31.8	(27.5-86.4)	0.94 <sup>b</sup>
p,p'-DDT	64.4	(43.2-85.6)	1.42 <sup>b</sup>
p,p'-DDE	4.2	(3.9-18.7)	1.19 <sup>b</sup>
Mirex	2.9	---	7 <sup>a</sup>
Σ BPC's	307.7	(0.0-12702.6)	34.1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration- Screening quick).

<sup>b</sup>CSQG (Canadian sediment Quality Guidelines for the protection of aquatic life).

<sup>c</sup>El valor de mirex no presenta desviación estándar o rango porque solo fue detectada en una muestra.





En este apartado es necesario mencionar que se realizó un monitoreo en la matriz agua, debido a que se consideró que por las características fisicoquímicas de los COP's no era prioritario analizarlas, puesto que a excepción del lindano (por tener una mayor solubilidad en agua) estos compuestos están asociados principalmente a sedimentos y materia orgánica (Ver Anexo 1). Sin embargo se debe enfatizar que hizo falta evaluar diversos parámetros fisicoquímicos del agua como pH, salinidad, temperatura, oxígeno disuelto, contaminantes biológicos, etc. los cuales pueden ser determinantes para el estado de salud de los organismos acuáticos.

#### *Cociente de peligrosidad (CP)*

Una comparación de las concentraciones medias registradas en la zona con las guías internacionales [(CSQG) y (NOAA)], se realizó para estimar el cocientes de peligrosidad (CP) de cada uno de los compuestos registrados en el sedimento de acuerdo a la fórmula:  $CP = C_e/C_b$  en donde  $C_e$  es la concentración de exposición y  $C_b$  la concentración de referencia (Suter II, 2007).

El análisis del cociente de peligrosidad (CP) determinó que para el HCB es de 13.3, el  $\alpha$ -HCH 54.4, el  $\beta$ -HCH 8.6, el  $\gamma$ -HCH 46.0, el DDT 45.3, el DDE 7.5 y la  $\Sigma$  BPC's 64.8, lo cual demuestra un alto potencial riesgo para la vida acuática de la región. Se deberá además considerar que la peligrosidad calculada es en función a la evaluación del compuesto por separado, lo cual podría subestimar el riesgo debido a que no se contemplan las posibles interacciones entre los diversos contaminantes evaluados y los reportados en otros estudios.



### *Fuentes potenciales de COP's en la zona de estudio*

Las concentraciones de HCH's (Cuadro 8) se registraron en las siguientes proporciones 79%  $\alpha$ -HCH, 10.4%  $\beta$ -HCH y el 10.4%  $\gamma$ -HCH, lo que corresponde a la formulación de HCH's grado técnico [ $\alpha$ -HCH 60-70%,  $\beta$ -HCH 5-12% y  $\gamma$ -HCH de 10-15%] (Yim *et al.*, 2005; CEC, 2006). Este compuesto ha sido utilizado ampliamente para control de parásitos en la ganadería en México (INE, 2004). En Coatzacoalcos así como en algunos municipios localizados río arriba (Minatitlán e Hidalgotitlán), cuentan con una considerable actividad ganadera [con 28,455, 128,930 y 312,900 cabezas de ganado respectivamente] (INEGI, 2008). Por lo cual es probable que exista un aporte importante de los diferentes isómeros del HCH por escorrentías hacia el Río Coatzacoalcos y un posterior arrastre y acumulación aguas abajo del río, es decir hacia la zona de estudio.

La presencia de HCB y mirex en la zona de Coatzacoalcos (Cuadro 8) probablemente se deba a que además de su uso como plaguicidas, fueron también utilizados en la industria como retardantes de flama; como ya se ha mencionado la principal actividad de Coatzacoalcos es industrial, por lo que no se descarta el hecho de que hayan sido utilizados. Por otra parte el HCB también puede ser generado como subproducto en la elaboración del monómero de cloruro de vinilo el cual es producido en la región (INE-SEMARNAT, 2003; Bozada y Bejarano, 2006). En cuanto a los BPC's (Cuadro 8) no fue posible identificar una fuente potencial en la región, sin embargo debido al uso que tuvieron los BPC's en la industria eléctrica como aceites para transformadores y capacitores, es probable que en la zona exista almacenamiento de transformadores con aceites que contengan BPC's.

La región de Coatzacoalcos se localiza en una zona endémica de paludismo por lo que el DDT se aplicó en grandes cantidades en las campañas de erradicación del vector (SSA, 2001). En México el DDT se dejó de aplicar en el año 2000 (ISAT, 2002), por lo que el DDT encontrado en la zona (Cuadro 8)



probablemente es DDT residual. Sin embargo la relación DDT/DDE (7.6) nos sugiere un uso actual del mismo, esto posiblemente por una aplicación de DDT de forma clandestina la cual ha sido reportada por algunos autores (Alegria *et al.*, 2000; Bullaz *et al.*, 2001). Por otra parte es importante señalar que se realiza en la zona un constante dragado del cauce del río, lo que provoca la re-suspensión de los sedimentos, lo que sumado al intenso dinamismo del ecosistema podría ser un factor de explicación para las concentraciones encontradas.

La cantidad y presencia de los diferentes COP's en los sedimentos de la zona es muy variable, esto debido principalmente a la dinámica inherente del río (intrusiones salinas, temperatura, salinidad, corrientes, etc.), a las características del tipo de sedimento (tamaño de partícula, contenido de materia orgánica, etc.), así como el tipo de flora y fauna que se encuentra en él, además de las actividades humanas (descargas, dragado, navegación, pesca, etc.). Esta intensa actividad y dinámica del río se ve reflejada en las concentraciones ambientales encontradas para la mayoría de los contaminantes, pues no se puede establecer un gradiente espacial de contaminación para los COP's. De esta manera, se tomó la decisión de considerar al área total de estudio como zona generalizada de exposición ambiental a estos contaminantes.

### **Monitoreo biológico**

En la misma fecha en que se realizó el muestreo ambiental, se llevó a cabo el monitoreo biológico para la obtención de muestras para la evaluación de los biomarcadores de exposición y efecto (Ver secciones correspondientes).

Debido a que los peces son organismos que tienen un amplio rango de movimiento, el muestreo se realizó en un área aproximada de 8 Km<sup>2</sup>, misma donde se recolectaron las muestras de sedimento (Figura 6). Los peces fueron



capturados con artes de pesca tradicional (ej. atarraya) con ayuda de pescadores de la región, en zonas bajas del río y utilizando el mismo esfuerzo de muestreo.

Se capturaron 31 peces pertenecientes a cinco especies: *Centropomus parallelus*, *Mugil cephalus*, *Eugerres axillaris*, *Oreochromis sp*, *Ariopsis felis* (Cuadro 9). Los organismos fueron medidos, pesados y clasificados por especie y hábito alimenticio (Anexo 3). Inmediatamente después de la captura se obtuvo una muestra de sangre de la vena caudal con una jeringa previamente heparinizada, las muestras fueron almacenadas a 4°C para su transporte y posterior análisis en el laboratorio. Una vez tomada la muestra de sangre, se realizó una disección a cada uno de los organismos para extraer el tejido muscular dorso lateral, mismo que se colocó en frascos de vidrio ámbar (previamente lavado mezcla crómica) y congelados hasta su análisis a -20°C.

**Cuadro 9.** Especies de peces capturados en el monitoreo biológico en la zona

<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre común</b>	<b>No. individuos</b>
<i>Centropomus parallelus</i>	Chucumite	9
<i>Mugil cephalus</i>	Lisa	7
<i>Eugerres axillaris</i>	Mojarra rayada	7
<i>Oreochromis sp</i>	Tilapia	5
<i>Ariopsis felis</i>	Bagre	3



## EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN

Para realizar la evaluación de los biomarcadores de exposición se cuantificaron las concentraciones de COP's en tejido muscular. Los compuestos orgánicos persistentes que se cuantificaron fueron  $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -HCH, HCB, aldrin, dieldrin, mirex,  $\alpha$ -,  $\gamma$ - clordano, oxiclordano, trans-,cis-nonaclor, epóxido de heptacloro, p,p'-DDT, p,p'-DDE y 14 congéneres de BPC's (IUPAC No 28, 52, 99, 101, 105, 118, 128, 138, 153, 156,187, 180, 183 y 170).

El método de extracción, separación y limpieza en tejido muscular se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido por Jensen *et al.*, (2003) con ligeras modificaciones. Diez gramos de tejido muscular fueron homogeneizados y extraídos con 25 mL de isopropanol, 10 mL de dietileter y 8 mL de una mezcla hexano:dietileter (9:1 v/v). El extracto fue filtrado y usado para la determinación gravimétrica de lípidos totales. Posteriormente fue evaporado a 37°C hasta un volumen de 0.5 mL. Para la limpieza las muestras se pasaron por una columna de sílica gel en donde fueron eluidas con 8 mL de una mezcla de metileno:hexano (3:1 v/v) y concentradas a 100  $\mu$ L. El endrin-C<sub>13</sub> y el BPC's 14-C<sub>13</sub> fueron utilizados como estándares internos y fueron adicionados a todas las muestras. El método cromatográfico utilizado fue el mismo que para sedimento. El límite de detección fue de 0.3  $\mu$ g/L (Ver Anexo 2 para método detallado). Las concentraciones en los tejidos fueron calculadas en peso fresco y normalizadas por el contenido de lípidos, esto se hizo para reducir la variabilidad, permitir comparaciones (intra e inter especies), evaluar las tendencias y describir los patrones espaciales de los contaminantes en la biota.

De los 29 compuestos cuantificados en las muestras únicamente se detectaron concentraciones de HCB,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -HCH, DDT, DDE, mirex y 6 congéneres de BPC's (52, 101, 105, 118, 138, 153) (Cuadro 10). Las mayores concentraciones registradas fueron de  $\beta$ -HCH,  $\alpha$ -HCH y mirex. El HCB fue detectado únicamente en un 26% de las muestras y solo en la especie *Mugil cephalus*. El  $\gamma$ -HCH y el DDT fueron registradas en un 32% y 10% de las muestras



respectivamente. Los contaminantes  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH, DDE, mirex y BPC's fueron detectados en el 100% de las muestras. Las especies en que se encontró un mayor número de compuestos fueron *Ariopsis felis* y *Eugerres axillaris* (7 y 6 respectivamente), sin embargo las mayores concentraciones fueron encontradas en *Eugerres axillaris*. Conforme a estos resultados las concentraciones de COP's en tejido muscular por especie decrecen en el siguiente orden  $\beta$ -HCH >  $\alpha$ -HCH > mirex > DDE > BPC's >  $\gamma$ -HCH > DDT > HCB.

Un análisis de similaridad (ANOSIM, Clarke and Warwick, 2001) seguido de una comparación entre pares de especies de peces y su hábito alimenticio fue usado para investigar las diferencias en el contenido de COP's en tejido. Un valor de "R" cercano a +1 indica que hay una clara diferencia en los patrones entre los grupos evaluados. Un valor cercano a cero significa que los patrones de distribución son similares entre los grupos. El nivel de significancia de "R" fue calculado por un prueba de permutaciones y fue considerado estadísticamente significativo a  $p < 0.05$ .



**Cuadro 10.** Concentraciones de COP's (ng/g lípido) en musculo de las especies colectadas en Coatzacoalcos, Veracruz

	<b>HCb</b>	<b>α-HCH</b>	<b>β-HCH</b>	<b>γ-HCH</b>	<b>DDT</b>	<b>DDE</b>	<b>Mirex</b>	<b>Σ BPC's</b>
Cepa (n=9)	N.D.	51.6 (2.1-735.5)	6.3 (1.8-64.5)	N.D.	N.D.	6.0 (1.9-26.2)	40.9 (6.9-75.3)	6.9 (1.8-45.7)
Muce (n=7)	6.9 (2.7-19.4)	18.0 (7.7-43.9)	2.7 (1.7-91.5)	N.D.	N.D.	24.5 (7.4-78.8)	43.1 (10.7-56.6)	3.6 (1.0-36.9)
Euax (n=7)	N.D.	27.5 (4.9-300.6)	287.3 (2.3-916.8)	8.7 (2.3-51.6)	N.D.	16.3 (3.6-27.5)	126.8 (18.2-218.7)	24.4 (15.6-48.0)
Orsp (n=5)	N.D.	27.5 (23.2-36.4)	2.0 (1.0-6.9)	N.D.	N.D.	14.7 (10.2-18.2)	36.6 (21.1-59.2)	2.0 (1.0-5.5)
Arfe (n=3)	N.D.	35.4 (26.1-36.2)	3.0 (1.1-3.8)	3.8 (3.6-10.1)	10.1 (3.6-12.6)	12.6 (3.6-23.7)	58.3 (52.2-72.4)	23.9 (9.9-103.5)
Todos los peces (n=31)	6.9 (N.D.-19.4)	27.9 (2.1-735.5)	3.8 (1.0-916.8)	8.4 (N.D.-51.6)	10.1 (N.D.-12.6)	14.7 (1.9-78.8)	52.2 (6.9-218.7)	6.9 (1.0-103.5)

Los valores representan la mediana y el rango. Cepa: *Centropomus parallelus*, Muce: *Mugil cephalus*, Euax: *Eugerres axillaris*, Orsp: *Oreochromis* sp, Arfe: *Ariopsis felis*. N.D.: no detectado.



Cuando los patrones identificados fueron diferentes, se usó un análisis de disimilitud de porcentajes (SIMPER) para identificar cuales contaminantes contribuyen más a las diferencias observadas. Diagramas de escalamiento multidimensional no métrico (nMDS) se construyeron para mostrar patrones de agrupamiento entre las especies de peces y sus hábitos de alimentación. Este análisis multivariado no paramétrico se realizó con el software estadístico PRIMER V.6.1.11 (PRIMER-E Ltd, UK 2006).

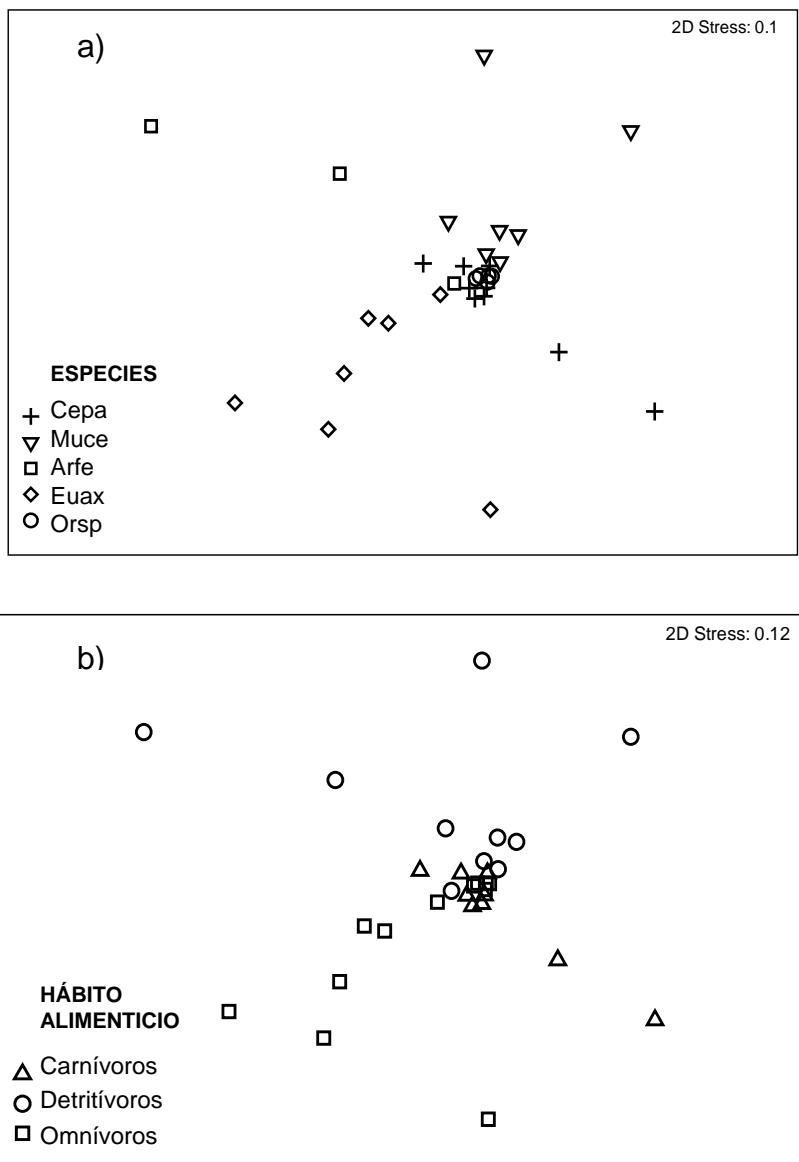
En la Figura 7a se presenta el diagrama de ordenación de las muestras de tejido por especie, en él se observa una diferenciación entre las concentraciones de COP's en las especies evaluadas. Estas diferencias fueron corroboradas con el ANOSIM (R Global=0.339,  $p < 0.001$ ). En el Cuadro 11 se muestra la comparación de pares de especies y las contribuciones por contaminantes (en orden de importancia mostrando al menos el 70% de disimilitud) en el grado de disimilitud de acuerdo al análisis SIMPER. Estos resultados muestran un grado de disimilitud alto (79- 99%), a excepción de las especies *Centropomus parallelus* y *Oreochromis* sp en las cuales no se encontraron diferencias. Las diferencias entre las especies evaluadas se deben principalmente a la carga corporal de los diferentes COP's evaluados. La especie *Ariopsis felis* registró las mayores concentraciones de BPC's y es la única que presentó DDT, *Mugil cephalus* es la única especie en que se detectó HCB y presentó las concentraciones más altas de DDE, *Eugerres axillaris* mostró las mayores concentraciones de lindano y  $\alpha$ ,  $\beta$ -HCH's, finalmente *Oreochromis* sp registró la menor carga corporal de COP's con respecto a las otras especies.

De acuerdo a la clasificación realizada en las especies evaluadas por hábito alimenticio (carnívoros: *Centropomus parallelus*, detritívoros: *Mugil cephalus* y *Ariopsis felis*, omnívoros: *Oreochromis* sp y *Eugerres axillaris*). Las especies con un mayor número de contaminantes registrados fueron los detritívoros, seguidos de los omnívoros y por último los carnívoros (Cuadro 12). El HCB y el DDT fueron detectados únicamente en las especies detritívoras. Para los detritívoros los





contaminantes encontrados y el orden de concentración de los mismos fue mirex >  $\alpha$ -HCH > DDE >  $\Sigma$  BPC's >  $\beta$ -HCH > HCB >  $\gamma$ -HCH y DDT. En los omnívoros se registraron  $\beta$ -HCH > mirex >  $\alpha$ -HCH >  $\Sigma$  BPC's > DDE >  $\gamma$ -HCH. En los carnívoros se registraron  $\alpha$ -HCH > mirex >  $\Sigma$  BPC's >  $\beta$ -HCH > DDE.



**Figura 7.** MDS de la distribución de contaminantes en tejido por (a) especies y (b) hábito alimenticio



**Cuadro 11.** ANOSIM para la comparación de contaminantes en tejido por especies and análisis SIMPER mostrando el grado de disimilaridad

	<b>Cepa</b>	<b>Muce</b>	<b>Euax</b>	<b>Orsp</b>
<b>Muce</b>	0.288 (97.2%)* HCB, DDE, $\alpha$ -HCH, $\Sigma$ BPC's			
<b>Euax</b>	0.481 (89.5%)* $\gamma$ -HCH, mirex, $\beta$ -HCH, $\alpha$ -HCH	0.517 (79.0%)* HCB, $\gamma$ -HCH, $\beta$ - HCH, mirex		
<b>Orsp</b>	---	0.241 (99.5%)* HCB, DDE, PCBs, mirex.	0.406 (94.5%)* $\Sigma$ $\beta$ -HCH, $\gamma$ -HCH, mirex, $\Sigma$ BPC's	
<b>Arfe</b>	0.495 (94.7%)* DDT, $\Sigma$ BPC's, $\alpha$ - HCH, DDE	0.548 (95.9%)* DDT, $\Sigma$ BPC's, HCB, DDE.	0.488 (84.9%)* DDT, $\Sigma$ BPC's, $\beta$ - HCH, mirex	0.744 (98.2%)* DDT, $\Sigma$ BPC's, $\gamma$ - HCH, mirex

Valores representan la R, (% contribución) y los contaminantes que contribuyen a la disimilaridad. Cepa: *Centropomus parallelus*; Muce: *Mugil cephalus*; Euax: *Eugerres axillaris*; Orsp: *Oreochromis* sp; Arfe: *Ariopsis felis*. \*p<0.05.

**Cuadro 12.** Concentraciones de COP's (ng/g lípido) en músculo de especies colectadas en Coatzacoalcos, Veracruz por habito alimenticio

	<b>HCB</b>	<b><math>\alpha</math>-HCH</b>	<b><math>\beta</math>-HCH</b>	<b><math>\gamma</math>-HCH</b>	<b>DDT</b>	<b>DDE</b>	<b>Mirex</b>	<b><math>\Sigma</math> BPC's</b>
Omnívoros (n=12)	N.D.	27.5 (4.9-300.6)	7.4 (1.0-916.8)	8.7 (2.3-51.6)	N.D.	15.5 (3.6-27.5)	83.9 (18.2-218.7)	15.6 (1.0-48.0)
Carnívoros (n=9)	N.D.	51.6 (2.1-735.5)	6.3 (1.8-64.5)	N.D.	N.D.	6.0 (1.9-26.2)	40.9 (6.9-75.3)	6.9 (1.8-45.7)
Detritívoros (n=10)	6.9 (N.D.-19.4)	30.6 (7.7-43.9)	2.9 (1.1-91.5)	3.8 (N.D.-10.1)	10.1 (N.D.-12.6)	20.4 (3.6-78.8)	53.6 (10.7-72.4)	4.7 (1.0-103.5)

Los valores representan la mediana y el rango. Carnívoros: *Centropomus parallelus*, detritívoros: *Mugil cephalus* and *Ariopsis felis*, omnívoros: *Oreochromis* sp and *Eugerres axillaris*. N.D. no detectado.



En la Figura 7b se presenta el diagrama de ordenación por niveles tróficos en donde se puede observar que las cargas corporales de los tres grupos (carnívoros, detritívoros y omnívoros). A pesar de que existe cierto grado de traslape, la prueba sugiere diferencias entre ellos (ANOSIM R global=0.111,  $p < 0.01$ ). Los resultados de los análisis ANOSIM y SIMPER de las comparaciones entre pares de tipos de hábito alimenticio y las contribuciones de los contaminantes, muestran que entre los omnívoros y detritívoros la disimilitud (0.159, 60.8%) está dada por el HCB, el DDT,  $\beta$ -HCH y el  $\gamma$ -HCH. Entre el grupo de carnívoros y detritívoros (0.127, 80.6%) la disimilitud se atribuye al HCB, el DDE, el  $\alpha$ -HCH y el DDT. Los detritívoros son los únicos que presentan concentraciones de HCB y DDT y a su vez presentan las menores concentraciones de HCH's y las mayores de DDE. En los carnívoros el  $\alpha$ -HCH es el que presenta las mayores cargas corporales.

Del análisis realizado tanto por especie como por hábito alimenticio las concentraciones de  $\beta$ -HCH y  $\alpha$ -HCH fueron las más abundantes, lo cual coincide con lo registrado por Lee *et al.*, (1997) y Yim *et al.*, (2005) en otras especies de peces. Esto puede ser explicado debido a que el  $\beta$ -HCH y el  $\alpha$ -HCH tiene un mayor factor de bioconcentración (log BCF 2.8 y 2.5 respectivamente) en animales acuáticos y son más persistentes que  $\gamma$ -HCH (log BCF 1.2) (Willett *et al.*, 1998). A pesar de que el HCH grado técnico tiene una mayor constitución de  $\alpha$ -HCH (60-70%), las concentraciones de  $\beta$ -HCH y el  $\alpha$ -HCH fueron muy similares, esto puede ser debido a que  $\alpha$ -HCH tiene una alta volatilidad (Constante de la ley de Henry  $6.68 \times 10^{-6} \text{ atm}^{-3}/\text{mol}$ ) y degradación en el ambiente, lo que puede causar una baja persistencia (Yim *et al.*, 2005). Otra posible explicación que corrobora esto es que el  $\alpha$ -HCH es más rápidamente metabolizado y excretado que  $\beta$ -HCH (Takazawa *et al.*, 2005).

El DDT fue detectado únicamente en *Ariopsis felis* mientras que el DDE fue detectado en todas las especies. Las mayores concentraciones se registraron en los peces detritívoros. Como se mencionó el DDT fue ampliamente usado en



México para el control del paludismo y debido a sus efectos tóxicos su uso fue eliminado. Procesos químicos y biológicos transforman el DDT en DDD y DDE, en particular el DDE ha sido el más registrado en biota (Takazawa *et al.*, 2005). Las concentraciones registradas en peces de la zona nos indican que están expuestos principalmente a DDT residual y a sus productos de degradación. Sin embargo como se vio, la relación DDT/DDE en sedimento sugiere un uso actual, razón por lo que se esperaría tener mayores concentraciones en los tejidos, lo que nos sugiere que los peces de la zona tienen la capacidad de metabolizar el DDT rápidamente.

Las concentraciones y distribución de COP's en los peces está controlada por muchos factores intrínsecos (especie, sexo, genética, estado de desarrollo, peso, longitud, edad, estado de salud, tasa metabólica y de eliminación, contenido de lípidos en organismo, hábitos alimenticios, etc.) y extrínsecos (estación del año, temperatura y calidad del agua) que pueden influir en la bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación de estos compuestos (Bremle y Larsson, 1998; Ashley *et al.*, 2000; Yim *et al.*, 2005). Las diferencias registradas entre los niveles de contaminantes podrían ser explicadas por variabilidad entre los individuos de la misma especie, así como por los hábitos alimenticios. Además deben ser consideradas las diferencias en la capacidad metabólica y en las características del hábitat entre especies (Naso *et al.*, 2003).

Van der Oost *et al.*, (1996) registró niveles de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -HCH, BPCs, DDT y DDE en peces de zonas industriales de Ámsterdam (73.5, 13.2, 18.7, 12065, 701.25, 1450 ng/g lípido respectivamente), éstos niveles son menores a los detectados en el presente estudio. De igual forma Zhou y Wong (2004) han reportado niveles de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -HCH para algunas regiones agrícolas de China (0.2, 4.5, < 0.01 ng/g lípido respectivamente) las cuales son menores a las registradas en los peces de Coatzacoalcos. Las concentraciones de  $\gamma$ -HCH y HCB registradas en la zona de estudio son mayores que las reportadas por Corsi *et al.*, (2005) en algunas zonas de la Laguna Orbetello, Italia ( $\gamma$ -HCH: 10.26, 6.3, 9.08 ng/g lípido;



HCB: 1.62, 1.78, 1.02, 2.12, 1.74 ng/g lípido) en la cual existen un impacto por actividades como: descargas de aguas residuales, acuacultura, turismo, industrial.

## EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS

Como se señaló anteriormente para la evaluación de los efectos se decidió evaluar el daño genotóxico a través del ensayo cometa. Este ensayo fue realizado en cuatro de las cinco especies que fueron recolectadas (*Centropomus parallelus* n=7, *Mugil cephalus* n=8, *Oreochromis sp* n=5, *Ariopsis felis* n=2). En la especie *Eugerres axillaris* no fue posible obtener las muestras de sangre debido a su tamaño (<10cm).

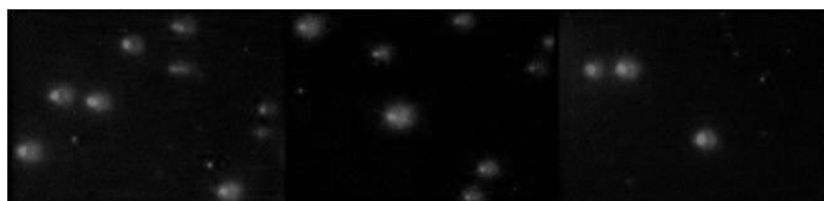
El ensayo cometa se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por Singh *et al.*, (1988) con ligeras modificaciones. Una alícuota de 5  $\mu$ L de sangre completa fue diluida en 240 $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión (37°C). Las laminillas fueron preparadas usando 15  $\mu$ L de la suspensión celular y 225  $\mu$ 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  $\mu$ 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 olive tail moment [(tail mean-head mean)\*tail%DNA/100] y el tail length (tail extent) de 100 células (50 de la muestra



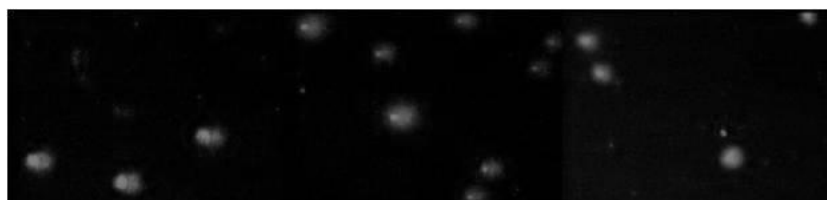
y 50 de la réplica) por individuo con un software analizador de imágenes (Komet 4.0; Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). (Ver Anexo 4 para método detallado)

En el presente trabajo se presenta el olive tail moment (OTM) y el tail length (TL) debido a que han mostrado ser los parámetros más útiles para evaluar el daño al ADN (Kumaravel *et al.*, 2009) y para facilitar la comparación con otros estudios. Las diferencias en el daño al ADN (OTM y TL) fueron evaluadas con una prueba de Kruskal-Wallis a un nivel de significancia estadística de  $p < 0.05$ , con el software analizador de datos STATISTICA (versión 6, StatSoft).

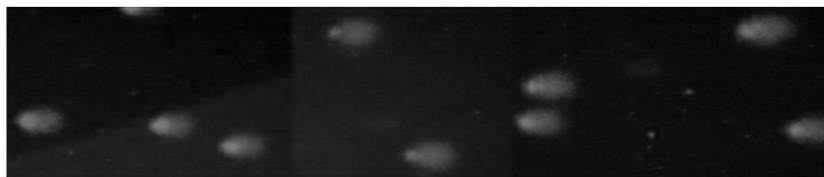
En las Figura 8-Figura 11 se presentan algunas imágenes de cometas de las células analizadas en cada una de las especies que se evaluó. Como se puede observar, cada especie presenta diferentes niveles de daño.



**Figura 8.** Imágenes de cometas en la especie *Mugil cephalus* de la zona de Coatzacoalcos, Ver



**Figura 9.** Imágenes de cometas en la especie *Centropomus parallelus* de la zona de Coatzacoalcos, Ver

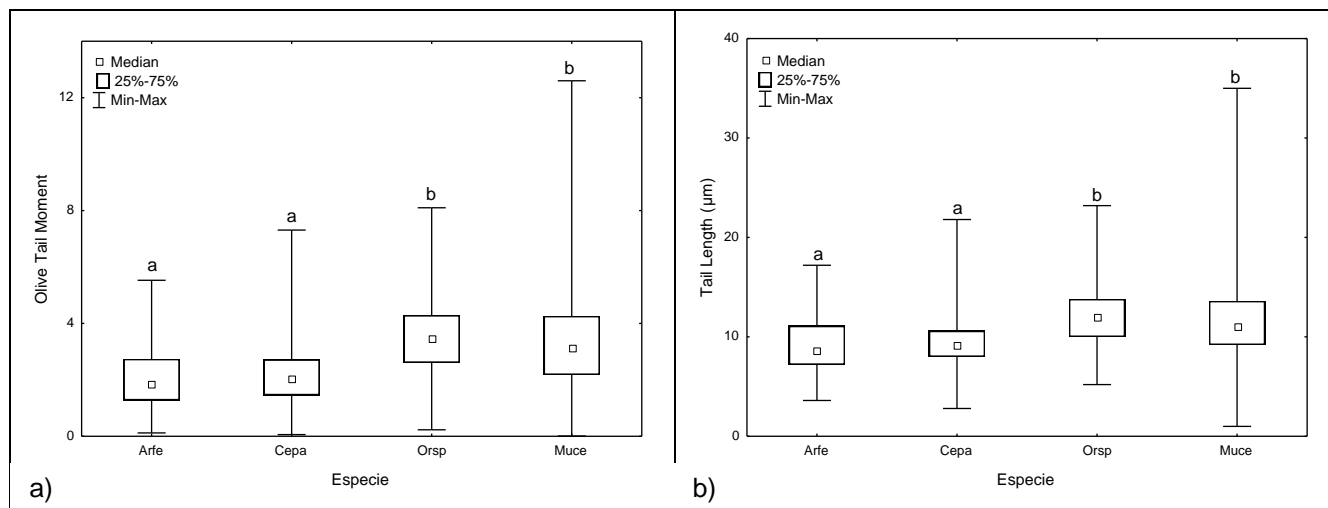


**Figura 10.** Imágenes de cometas en la especie *Oreochromis* sp de la zona de Coatzacoalcos, Ver

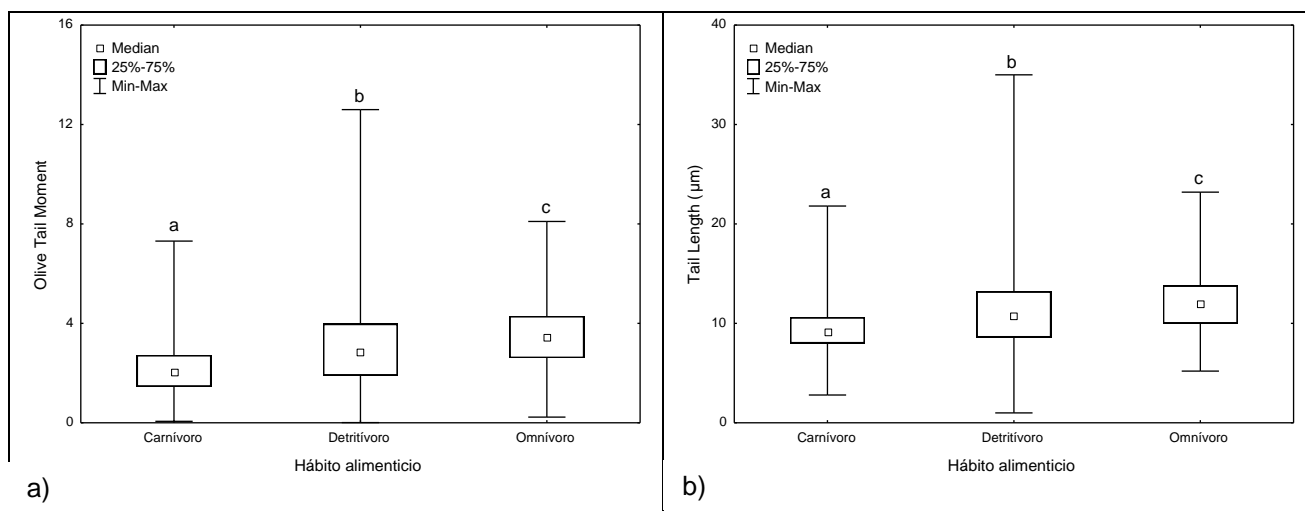


**Figura 11.** Imágenes de cometas en la especie *Ariopsis felis* de la zona de Coatzacoalcos, Ver

Las especies que presentaron menor daño al ADN fueron *Ariopsis felis* [OTM 2.0 (0.12-5.5); TL 9.26 $\mu$ m (3.6-17.2)] y *Centropomus parallelus* [OTM 2.2 (0.6-7.3); TL 9.4 $\mu$ m (2.8-21.8)] comparadas con *Mugil cephalus* [OTM 3.3 (0.01-12.6); TL 11.6 $\mu$ m (1.0-35.0)] y *Oreochromis* sp [OTM 3.5 (0.2-8.1); TL 11.9 $\mu$ m (5.2-23.2)] que presentan un mayor daño ( $p < 0.01$ ) (Figura 12 a, b). Con base en el hábito alimenticio Figura 13 (a y b), se observó que las especies carnívoras presentaron menor daño de ADN, mientras que las omnívoras registraron mayor daño al ADN ( $p < 0.01$ ). Esto podría explicarse principalmente a las diferentes rutas de exposición, ya que los organismos detritívoros se encuentran en contacto directo con los contaminantes adheridos en las partículas del sedimento, y los organismos omnívoros pueden incorporar múltiples contaminantes biodisponibles de diversas fuentes debido sus preferencias alimenticias, las cuales son más limitadas en organismos carnívoros. Cabe mencionar que el efecto observado en las especies evaluadas en este estudio no es atribuible únicamente a la exposición COP's, sino que puede ser atribuible a otros contaminantes presentes en el sitio y que no fueron evaluados (ej. Metales y HAP's), por lo que el ensayo cometa es una herramienta integral que nos permite la evaluación de la exposición a la mezcla de contaminantes genotóxicos.



**Figura 12.** Olive tail moment (a) y Tail length (b) en las especies *Ariopsis felis* (Arfe), *Centropomus parallelus* (Cepa), *Mugil cephalus* (Muce) y *Oreochromis sp.* (Orsp) en el área de Coatzacoalcos, Ver. Diferente letra indica diferencias significativa  $p < 0.01$



**Figura 13.** Olive tail moment (a) y Tail length (b) en las especies evaluadas por hábito alimenticio. Carnívoro: *Centropomus parallelus* (n=7); detritívoros: *Mugil cephalus* and *Ariopsis felis* (n= 10); omnívoro: *Oreochromis sp.* (n=5). Diferente letra indica diferencias significativa  $p < 0.01$ .





La medición del ensayo cometa se ha realizado a través de diversos parámetros (score damage, OTM, TL, entre otros) lo que representa unas de sus principales desventajas ya que no existe una forma estandarizada de medirlo y reportarlo (Kumaravel *et al.*, 2009) lo cual limita la comparación con otros estudios. Russo et al (2004) realizaron un estudio en el cual compararon el daño al ADN en peces provenientes de un sitio contaminado con una mezcla de compuestos genotóxicos (Río Sarno; TL $\approx$ 8 $\mu$ m) y en un sitio de referencia (Lago Astroni, TL  $\approx$ 3). El daño al ADN registrado en los peces del Río Coatzacoalcos (TL= 10.4  $\pm$  1.3) son similares e incluso superiores a lo reportado por estos autores.

El daño al ADN registrado en las especies de peces de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos es una evidencia de la exposición a contaminantes genotóxicos. Lo cual podría reflejar el grado de estrés ambiental en el que se encuentran los organismos acuáticos de la región. Esto es de particular importancia debido a que el daño al ADN es producido tanto en células somáticas como germinales y si no es reparado o es reparado ineficientemente, este se verá reflejado tanto en la salud del organismo como en su reproducción (Jha, 2008). Consecuentemente esto podría dar lugar a efectos adversos a largo plazo en otros niveles de organización, los cuales tendrían que evaluarse en estudios posteriores en la región.



## **CARACTERIZACIÓN DE RIESGO**

En esta etapa de la metodología son integrados todos los resultados obtenidos en las etapas de evaluación de la exposición y evaluación de los efectos para determinar si existe o no el riesgo. En nuestro caso esta integración se hizo a través del enfoque de peso de la evidencia. Este enfoque se realiza sobre líneas de evidencia, las cuales son inferencias de la relación entre dos eventos (causa y efecto).

### **Líneas de evidencia**

Las líneas de evidencia seleccionadas para la caracterización fueron: 1) Contaminación ambiental; 2) Exposición a contaminantes y 3) Efectos por exposición (Cuadro 13). Cada una de estas líneas fue ponderada de acuerdo a la información que fueron proporcionando al análisis de riesgo, aquellas líneas que fueron consistentes con la información proporcionada fueron señaladas con (+++), las líneas que resultaron en una información ambigua o que no aportaron mayor información se señalaron con (±) y por último aquellas líneas que aportaron información inconsistente fueron marcadas con (---).



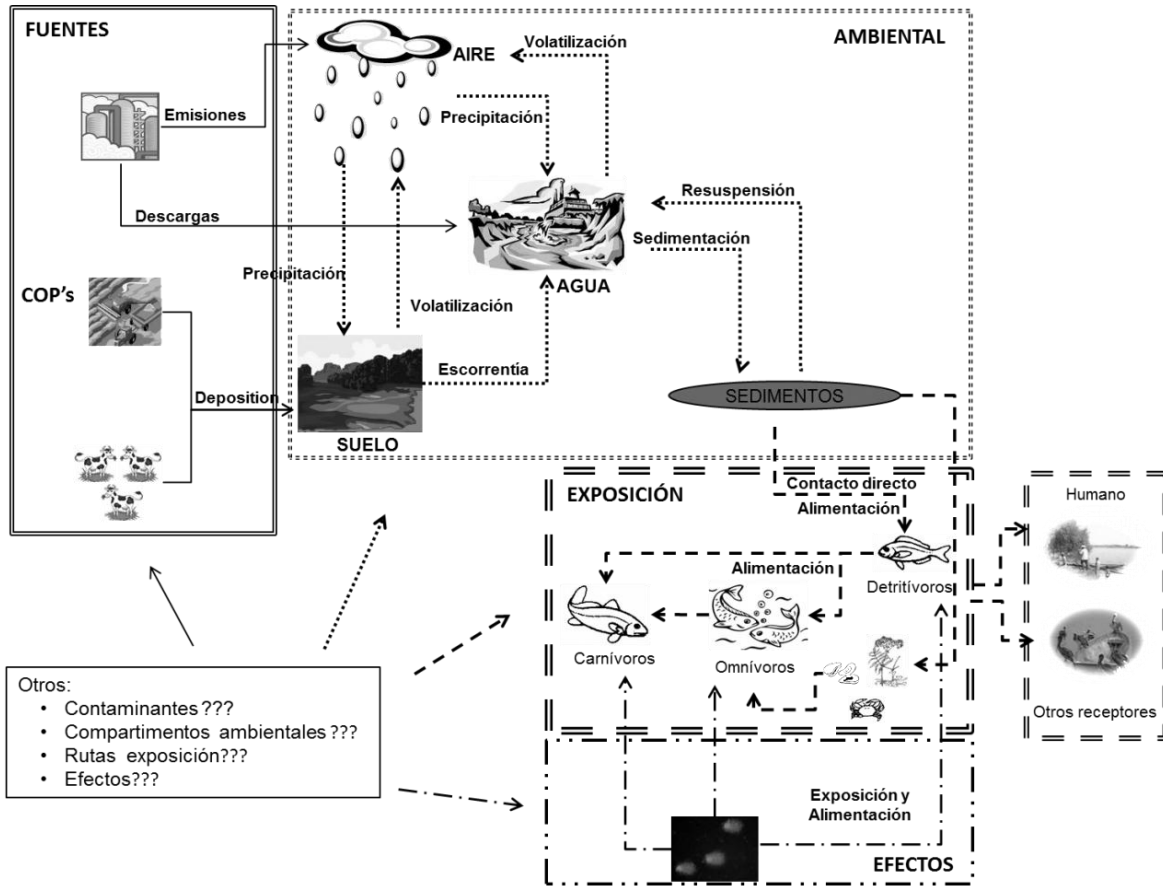
**Cuadro 13.** Análisis de líneas de evidencia de riesgo para el sistema acuático del Coatzacoalcos, Ver

<b>Evidencia</b>	<b>Resultado</b>	<b>Explicación</b>
<b>Contaminación ambiental</b>	(+++)	Las concentraciones registradas representan un riesgo para la fauna acuática.
	(---)	Las concentraciones no reflejan un gradiente a partir de una fuente puntual
	(±)	Compuestos en diferentes matrices ambientales (suelo y sedimento), pero en concentraciones diferentes.
	(---)	Carencia de datos previos para todos los contaminantes
	(---)	Las concentraciones encontradas no corresponden con los niveles esperados, de acuerdo con estudios previos.
<b>Exposición a contaminantes</b>	(+++)	Compuestos encontrados en tejido corresponden con compuestos encontrados en ambiente.
	(+++)	Mismos patrón de presencia en otros receptores ecológicos.
	(+++)	Presencia de COP's en tejido muscular representa un riesgo para otras especies.
	(---)	Carencia de datos de estudios previos en la zona.
<b>Efectos por exposición</b>	(+++)	Daño al ADN refleja el estrés al que se encuentran sometidas las especies.
	(±)	El efecto genotóxico observado en las especies evaluadas no es atribuible únicamente a la exposición COP's, sino que puede ser imputable a otros contaminantes presentes en el sitio y que no fueron evaluados.
	(+++)	Efecto encontrado en otros receptores ecológicos y el humano.
	(+++)	Valores registrados similares a los de otros sitios contaminados con COP's.

(+++) Línea de evidencia consistente, (---) Línea de evidencia inconsistente, (±) Línea de evidencia ambigua.

## Modelo final del sistema acuático

Una vez reunidas y analizadas todas las líneas de evidencia generadas en la presente evaluación de riesgo se generó un modelo final del sitio (Figura 14) haciendo énfasis en el sistema acuático. El modelo fue dividido en cada una de las etapas de la metodología (evaluación ambiental, evaluación de la exposición y evaluación de los efectos). Dentro de este nuevo modelo se consideraron únicamente como contaminantes a las COP's (evaluados en este trabajo). Por otra parte en él se incluye un recuadro (Otros) de las principales incertidumbres detectadas en la evaluación.



**Figura 14.** Modelo conceptual final del sitio con énfasis en el sistema acuático



## Incertidumbres y Limitaciones

Una evaluación del riesgo ecológico está generalmente limitada por la incertidumbre y/o limitaciones respecto a los datos relevantes recabados durante el estudio, por tal razón en el Cuadro 14 se muestran las incertidumbres y/limitaciones que se detectaron y las sugerencias sobre qué acciones se pueden realizar para minimizarlas.

**Cuadro 14.** Incertidumbres y/o limitaciones detectadas en la evaluación de riesgo ecológico del sistema acuático de Coatzacoalcos, Ver

	<b>Incertidumbres y/o limitación</b>	<b>Sugerencias</b>
<b>Contaminación ambiental</b>	Identificación de fuentes	Realizar una caracterización de principales fuentes, tanto puntuales como no puntuales.
	Contaminantes no evaluados	Evaluar otros contaminantes críticos como HTP's, HAP's y COV's.
	Medios no evaluados	Realizar monitoreo medios que representen un riesgo: Agua.
	Evaluación de parámetros de calidad de agua.	Realizar monitoreo en diferentes épocas del año, para conocer la calidad del agua a través del tiempo.
	Representatividad de muestras	Realizar un monitoreo ambiental que abarque mayor área y aumentar el tamaño de muestra por sitio, así como diferentes épocas del año.
<b>Exposición a contaminantes</b>	Rutas de exposición no evaluadas	Evaluar otras posibles rutas de exposición como: agua y alimento.
	Otros grupos receptores	Evaluar la exposición en otros grupos receptores para ver el comportamiento en otros grupos acuáticos.
	Número de muestra	Aumentar el número de muestras de organismos para disminuir la variabilidad en los datos.
	Otros contaminantes	Evaluar la exposición de otros contaminantes en los organismos por ejemplo: metales y PAH's.
<b>Efectos por exposición</b>	Ausencia de valores de referencia	Establecer bioensayos para conocer valores.
	Otros efectos	Ampliar la batería de biomarcadores para evaluar el posible efecto de otros contaminantes.
	Exposición a mezclas	Evaluación de biomarcadores que engloben diferentes efectos y/o que sean más específicos.
	Efectos en otros niveles de organización.	Evaluar niveles de organización superiores los cuales aportan mayor relevancia ecológica.



## CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en este estudio muestran la importancia de determinar la presencia de contaminantes en el ambiente, su bioacumulación en los tejidos y sus efectos en los organismos expuestos para realizar una aproximación integrada en la evaluación de los efectos de contaminación en el ambiente.

La cantidad y presencia de los diferentes COP's en los sedimentos que se encuentran en la región son variables, esto debido de la dinámica inherente del río. Las concentraciones de COP's en sedimento superan los niveles de protección establecidos por las guías internacionales (CSQG y NOAA) por lo que representan un riesgo para los organismos acuáticos de la región.

El análisis de cociente de peligrosidad demostró un alto potencial de riesgo, sin embargo se debe considerar que está en función a la evaluación del compuesto por separado, lo cual podría subestimar el riesgo debido a que no se contemplan las posibles interacciones entre los diversos contaminantes evaluados y otros contaminantes presentes en la zona.

Las concentraciones ambientales registradas en la zona no muestran un patrón de distribución claro a partir de una fuente de contaminación puntual, por lo se considera una zona generalizada de exposición a COP's.

Se demostró que los peces recolectados en la cuenca baja del Río Coatzacoalcos están expuestos a COP's. Todas las especies evaluadas son fuente de alimento para la población humana, así como para otras especies de fauna silvestre, por lo que la ingesta de carne de estas especies de peces podría representar una importante ruta de exposición a COP's.

Las concentraciones en tejido reflejan el mismo patrón de presencia que las muestras ambientales, por lo que se considera un buen biomarcador de exposición.



La exposición a COP's que presentan los peces evaluados está principalmente ligada a su hábito alimenticio.

Las diferencias registradas entre los niveles de contaminantes podrían ser explicadas por variabilidad entre los individuos de la misma especie, así como por los hábitos alimenticios. Sin embargo es importante que se consideren las diferencias en la capacidad metabólica y en las características del hábitat entre especies, para futuros estudios.

El daño al ADN registrado en las especies de peces es una evidencia de la exposición a la mezcla de contaminantes genotóxicos, que aunado a la exposición a COP's refleja el grado de estrés ambiental en el que se encuentran los organismos acuáticos de la región.

El efecto genotóxico observado en las especies evaluadas no es atribuible únicamente a la exposición COP's, sino que puede ser imputable a otros contaminantes presentes en el sitio y que no fueron evaluados; razón por la cual el ensayo cometa es considerada una herramienta integral para la evaluación de la exposición a la mezcla de contaminantes genotóxicos.

Este estudio ofrece datos de referencia sobre el estado de la contaminación por COP's en la región de Coatzacoalcos, Veracruz. Dada la magnitud de la exposición a COP's y otros contaminantes, son necesarios más estudios en diversos organismos y en diferentes ambientes, en particular aquellos enfocados a la evaluación de efectos subletales a nivel individual y en diferentes niveles de organización biológica ocasionados por la exposición a la mezcla de contaminantes, a fin de monitorear el estado de salud de la biota en la región y proponer medidas de regulación y control de descargas.

Contemplando que la aplicación de esta metodología en la zona de Coatzacoalcos generó líneas de evidencia sólidas, se considera que está



metodología puede ser aplicable en otros sitios contaminados de México con algunas modificaciones.

## BIBLIOGRAFÍA

Adams S.M., Bevelhimer M.S., Greeley M.S., Levine D.A., Teh S.J. 1999. Ecological risk assessment in a large river reservoir: 6. Bioindicators of fish population health. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:628–640.

Alegria H.A., Bidleman T.F., Shaw T.J. 2000. Organochlorine pesticides in ambient air of Belize, Central America. *Environ. Sci. Technol.* 34: 1953-1958.

Albert L. 2004. *Toxicología ambiental*. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México. 455 p.

Albert L., Bozada-Robles L., Uribe-Juárez J., López-Portillo J., Méndez-Alonzo R., Antonio-Soto K., de los Reyes-Trejo O. y Torres-Nanchon, J. 2005. *Evaluación instantánea de los efectos del derrame de petróleo en el área de Nanchital-Coatzacoalcos, Veracruz (22 de diciembre de 2004)*. 665-680 pp. En: Botello A.V., Rendón-Von Osten J., Gold-Bouchot G. y Agraz-Hernández C. (Eds.). *Golfo de México Contaminación e Impacto ambiental: Diagnostico y Tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Autónoma de México, Instituto de Ecología. 696 p.

Ashley J.T., Secor D.H., Zlokovitz E., Wales S.Q., Baker J.E. 2000. Linking habitat use of Hudson River striped bass to the accumulation of polychlorinated biphenyls congener. *Environ. Sci. Technol.* 34:1023–1029

ATSDR .1995. *Toxicological profile for mirex and chlordecone*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 333 pp





ATSDR. 2000. *Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs)*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 765 pp

ATSDR. 2002a. *Toxicological profile for hexachlorobenzene*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 352 pp.

ATSDRb. 2002b. *Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 403 pp.

ATSDR. 2005. *Toxicological profile for alpha-, beta-, gamma-, and delta-hexachlorocyclohexane*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 325 pp.

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-pdioxin Using Internal Measures of Dose. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 3534-3543

Bahena-Manjarrez J.L., Rosales-Hoz L., Carranza-Edwards A. 2002. Spatial and temporal variation of heavy metals in a tropical estuary. *Environ. Geol.* 42:575-582

Botello V.A., Páez F. 1987. *El problema crucial: la contaminación*. Centro de Ecodesarrollo, México 180 pp.

Botello V.A., Rueda-Quintana L., Díaz-González G., Toledo A. 2000. Persistent organochlorine pesticides (POPS) in coastal lagoons of the subtropical mexican pacific. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64:390-397. doi: 10.1007/s001280000013

Botello V.A., Rendón-Von Osten J., Gold-Bouchot G., Agraz-Hernández C. (eds.) 2005. *Golfo de México contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Autónoma de México, Instituto de Ecología. 696 p.



Bozada R.L., Bejarano G.F. 2006. *Los contaminantes orgánicos persistentes en el istmo mexicano*. International POPs Elimination Network (IPEN), Mexico, 79 pp.

Disponible en: <http://noalaincineracion.org/wp-content/uploads/ReportePOPSIstmo.pdf>. Última visita Marzo 2010

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*, pp 681-696. A.V. Botello, J. Rendón-Von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). *Golfo de México Contaminación e Impacto ambiental: Diagnostico y Tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Autónoma de México, Instituto de Ecología. 696p.

Bozada L. y Páez M. 1986. *Fauna acuática del Río Coatzacoalcos*. Centro de Ecodesarrollo, México 121 p.

Brasher A. M. D. y Wolff R. H. 2004. Relations between land use and organochlorine pesticides, PCBs, and semi-volatile organic compounds in streambed sediment and fish on the Island of Oahu, Hawaii. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46: 385–398. DOI: 10.1007/s00244-003-3019-4.

Bremle G., Larsson P. 1998. PCBs in Eman river ecosystem. *Ambio* 27:384-92

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.

Balluz L., Moll D., Diaz M.M., Merida C.J., Malilay J. 2001. Environmental pesticide exposure in Honduras following hurricane Mitch. *Bull. World. Health Organ.* 79:288-295.

CEC. 2006. *The North American Regional Action Plan (NARAP) on lindane and other hexachlorocyclohexane (HCH) isomers*. Commission for Environmental



Cooperation (CEC), 51pp. Disponible en:  
[http://www.cec.org/Storage/36/2797\\_NARAP\\_on\\_Lindane\\_and\\_Other\\_Hexachloro\\_cyclohexane\\_Isomers.pdf](http://www.cec.org/Storage/36/2797_NARAP_on_Lindane_and_Other_Hexachloro_cyclohexane_Isomers.pdf). Última visita Marzo 2010.

Celis L., Botello A.V., Mendelewicz M., Díaz G. 1987. Actividades del proyecto CARIPOL en la zona costera de México: I. Hidrocarburos disueltos. *Caribb. J. Sci.* 23:11-18.

Chambers, L.E., J.S. Boone, R.L. Carr y H.W. Chambers. 2002. Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. *Human and Ecol. Risk Assess.* 8(1): 165-176.

Christofoletti C. A., David J. A. y Fontanetti C. S. 2009. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): A methodological comparison. *Genetics and Molecular Biol.* 32(1):155-158.

Clarke K.R., Warwick R.M. 2001. *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*, 2nd edition. PRIMER-E, Plymouth, 172 pp.

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

Corsi I., Mariottini M., Badesso A., Caruso T., Borghesi N., Bonacci S., Lacocca A. y Focardi S. 2005. Contamination and sub-lethal toxicological effects of persistent organic pollutants in the European eel (*Anguilla anguilla*) in the Orbetello lagoon (Tuscany, Italy). *Hydrobiologia* 550:237–249.

Dhawan A., Bajpayee M., Parmar D. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell. Biol. Toxicol.* 25:5-32. doi 10.1007/s10565-008-9072-z.

Di Giulio R.T. and Hinton D.E. 2008 *The toxicology of fishes*. Ed. CRC Press, Florida, 1071pp.



Environmental Agency-UK. 2003. *Ecological risk assessment*. Environment Agency- United Kingdom. (E. A.-UK). 100 pp.

Erickson R. J., Nichols J. W., Cook P. M. and Ankley G. T. 2008. *Bioavailability of Chemical Contaminants in Aquatic Systems* p 9-54 en: Di Giulio R.T. and Hinton D.E (Eds.). *The toxicology of fishes*. Ed. CRC Press, Florida, 1071pp.

Espinosa-Reyes G., Ilizaliturri C.A., González-Mille D.J., Costilla R., Díaz-Barriga F., Cuevas M.C., Martínez M.A., 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. *J. Environ. Science and Health Part A* 45, 49–55. doi: 10.1080/10934520903388731

Farrán A., Grimalt J., Albaigés J., Botello A.V., Macko S.A. 1987. Assessment of petroleum pollution in a Mexican river by molecular markers and carbon isotope ratios. *Marine Pollut. Bull.* 18: 284-289.

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

García E. 2004. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. 4ta ed. Offset Larios, México, 218 pp.

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

INE. 2004. *El lindano en México*. Instituto Nacional de Ecología (INE), México, 67 pp. Disponible en: [http://www.ine.gob.mx/descargas/sqre/el\\_lindano\\_en\\_mexico.pdf](http://www.ine.gob.mx/descargas/sqre/el_lindano_en_mexico.pdf). Última visita: Marzo 2010.

INE-SEMARNAT. 2003. *El hexaclorobenceno en perspectiva*. Instituto Nacional de Ecología (INE), Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), México, 56 pp. Disponible en:



[http://www.ine.gob.mx/descargas/sqre/informe\\_final\\_pni\\_hexaclorobenceno.pdf](http://www.ine.gob.mx/descargas/sqre/informe_final_pni_hexaclorobenceno.pdf).

Última visita: Marzo 2010.

INEGI. 2008. *Anuario estadístico de Veracruz de Ignacio de la Llave: ganadería*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/sisnav/default.aspx?proy=ae&edi=2008&ent=30>. Última visita: Sep. 2009.

ISAT. 2002. *Diagnostico situacional del uso de DDT y el control de la malaria: informe regional para México y Centroamérica*. Instituto de Salud, Ambiente y Trabajo (ISAT), México, 58 pp. Disponible en: [http://www.cec.org/Storage/44/3646\\_InfRegDDTb\\_ES\\_EN.pdf](http://www.cec.org/Storage/44/3646_InfRegDDTb_ES_EN.pdf). Última visita: Marzo 2010.

Jensen S., Hägggerg L., Jörundsdóttir H., Odham G. 2003. A quantitative lipid extraction method for residue analysis of fish involving nonhalogenated solvents. *J. Agric. Food. Chem.* 51:5607-5611.

Jha A.N. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23:207-221. doi: 10.1093/mutage/gen014

Kendall, R.J. *et al.* 2001. *Ecotoxicology*, in *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, Klaassen, C.D., Ed., McGraw-Hill, New York, pp. 1013–1045.

Klobučar G. I. V., Štambuk A., Pavlica M., Sertić P. M. Kutuzović H., Hylland. 2010. Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology* 19:77–84. doi 10.1007/s10646-009-0390-6.

Kumaravel T.S., Vilhar B., Faux S.P., Jha A.N. 2009. Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol* 25:53-6. doi: 10.1007/s10565-007-9043-9.

Lee J.S., Tanabe S., Takemoto N., Kubodera T. 1997. Organochlorine residues in deep-sea organisms from Suruga Bay, Japan. *Mar. Pollut. Bull.* 34:250-258



Lee R.F., 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.

López-Portillo, E. 2000. *Río Coatzacoalcos*. (Serie Ríos de México). Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa -Online Communications-México. <http://sepiensa.org.mx/contenidos/2004/coatzacoalcos/coatzacoalcos.htm>

Morales M.A., Herrero V.M., Martínez S.A., Rodríguez M.G., Valdivieso E., García G., Elías M.A. 2006 Cleaner production and methodological proposal of eco-efficiency measurement in a mexican petrochemical complex. *Water Sci. Tech.* 53: 11-16

Mukhtasor., T. Husain, B. Veitch, and N. Bose. 2004. An ecological risk assessment methodology for screening discharge alternatives of produced water. *Human and Ecol. Risk Assess.* 10: 505–524.

Nacci D.E., Cayulab S., Jackim E. 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat. Toxicol.* 35:197-210.

Naso B., Perrone D., Ferrante M.C., Zaccaroni A., Lucisano A. 2003. Persistent organochlorine pollutants in liver of bird of different trophic levels from coastal areas of Campania, Italy. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45:407-414. doi: 10.1007/s00244-0032201-z.

OPS. 1999. *Metodología de Identificación y evaluación de riesgos para la salud en sitios contaminados*. Organización Panamericana de la Salud. OPS/Cepis/Pub/99.34.

Páez-Osuna F., Botello A.V., Villanueva S. 1986. Heavy metals in Coatzacoalcos estuary and Ostion lagoon, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 17:516-519.



Pelcastre Villafuerte L. y Flores Villela O. A. 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.

Ponce Vélez G. y Botello V. A. 2005. *Niveles de hidrocarburos en el Golfo de México*, p. 269-298. En: A.V. Botello, J. Rendón-Von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). *Golfo de México Contaminación e Impacto ambiental: Diagnostico y Tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Autónoma de México, Instituto de Ecología. 696p.

Ramondetta Miriam and Reposi Alessandra. 1998. *Seveso 20 years after: from dioxin to the Oak wood*. Fondazione Lombardia per l'Ambiente, Milano.

Rosales-Hoz L., Carranza-Edwards A. 1998 Heavy metals in sediments from Coatzacoalcos river, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60:553-561.

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

Russo C., Rocco L., Morescalchi M.A., Stingo V. 2004. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol. Environm. Saf.* 57:168-174. doi:10.1016/S0147-6513(03)00027-7.

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

Serveiss, V. B. 2002. Applying ecological risk principles to watershed assessment and management. *Environ. Manag.* 29(2): 145–154.



Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175:184-191.

Shugart, L.R. 2000. DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology*, 9: 329-340.

Shugart L. y Theodorakis C. 1998. New trends in biological monitoring: application of biomarkers to genetic ecotoxicology. *Biotherapy* 11: 119–127.

SSA. 2001. *Programa de acción: enfermedades transmitidas por vector*. Secretaría de Salud, México 72 pp.

Staniskiene B., Matosevicius P., Budreckiene R., Skibniewska K.A. 2006. Distribution of heavy metals in tissues of freshwater fish in Lithuania. *Pol. J. Environ Stud.* 15:585-501

Stringer R., Labunska I., Brigden K. 2001. *Organochlorine and heavy metal contaminants in the environment around the complejo petroquímicos Paharitos, Coatzacoalcos, Mexico*. Technique note Greenpeace Research Laboratories, University of Exeter, UK, 60 pp.

Suter II G.W. 2007. *Ecological risk assessment*, 2nd ed. CRC Press, Florida, 643 pp.

Takazawa Y., Kitamura K., Yoshikane M., Shibata Y., Morita M., Tanaka A. 2005. Distribution patterns of hexachlorocyclohexanes and other organochlorine compounds in muscles of fish from a japanese remote lake during 2002–2003. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74:652–659. doi: 10.1007/s00128-005-0633-z

Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology test. *Environ. Mol. Mutagen.* 35:206-221.





Torres A., Espinosa-Reyes G., Ilizaliturri C., González D., Razo I., Mejía J., Díaz-Barriga F. 2005. *Desarrollo de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios peligrosos de México*. Instituto Nacional de Ecología. (INE) México, Distrito Federal. 130 p. Disponible en línea: [http://www.ine.gob.mx/dgicur/sqre/descargas/2005\\_inf\\_final\\_met\\_integrada.pdf](http://www.ine.gob.mx/dgicur/sqre/descargas/2005_inf_final_met_integrada.pdf)

Trejo-Acevedo A., Díaz-Barriga F., Carrizales L., Domínguez G., Costilla R., Ize-Lema I., Yarto-Ramírez M., Gavilán-García A., Mejía-Saavedra J.J., Pérez-Maldonado I.N. 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.

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

Van der Oost R., Opperhuizen A., Satumalay K., Heida H., Vermeulen N.P. 1996. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquat Toxicol* 35:21-46

Walker C. H. 2009. *Organic pollutants: an ecotoxicological perspective*. 2nd ed. CRC Press Boca Raton, FL, 408 pp

Werner I., Clark S.L. Hinton D.E. 2003. Biomarker aid understanding of aquatic organism responses to environmental stressors. *California agriculture* 57(4): 110-115.



Willett K.L., Ulrich E.M., Hites R.A. 1998. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environ. Sci. Technol.* 32:2197-2207.

Yim U.H., Hong S.H., Shim W.J., Oh J.R. 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.

Zhou H.Y., Wong M.H. 2004. Screening of organochlorines in freshwater fish collected from the Pearl river delta, People's Republic of China. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46:106-113. doi: 10.1007/s00244-003-2197-4.



## ARTÍCULO

**Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an  
indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of  
Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico**

Artículo aceptado en Ecotoxicology [DOI: 10.1007/s10646-010-0508-x]

Publicado en línea: 20 Junio 2010

# Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico

Donaji J. González-Mille · César A. Ilizaliturri-Hernández ·  
Guillermo Espinosa-Reyes · Rogelio Costilla-Salazar ·  
Fernando Díaz-Barriga · Irina Ize-Lema · Jesús Mejía-Saavedra

Accepted: 2 June 2010  
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

**Abstract** The region of Coatzacoalcos, Veracruz hosts one of the largest and most important industrial areas of Mexico and Latin America. Industrial development and rapid population growth, have triggered a severe impact on aquatic ecosystems of the region. The aim of this study was to determine the levels of POPs in sediment and in muscle tissue of five fish species from different trophic levels in downstream residents of the Coatzacoalcos River, and their integration with DNA damage in the fish, evaluated with the comet assay in whole blood as a biological indicator of stress, in order to obtain a baseline of the ecological condition of the region. The compounds detected in sediment and in muscle tissue were hexachlorobenzene (HCB),  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane (HCH), dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE), mirex and polychlorinated biphenyls (PCBs). Sediment concentrations of these pollutants (except for mirex) exceeded the values of protection provided by international guidelines, suggesting a potential risk to aquatic life in the region. DNA damage recorded in the fish species is evidence of exposure to a mix of genotoxic

pollutants, which combined with exposure to POPs, reflects the degree of environmental stress of aquatic organisms in the region. The results of this study show the importance of determining the presence of contaminants in the environment, the bioaccumulation in tissues and their effects on exposed organisms, providing an integrated approach in assessing the health of aquatic ecosystems.

**Keywords** Persistent organic pollutants · Comet assay · Fish · Sediments · Coatzacoalcos River

## Introduction

In recent decades, dependence on natural resources has become critical for mankind. Fishing is one of the most important resources exploited by humans worldwide (Lionetto et al. 2004). However, rapid population growth coupled with rapid industrial development and changing lifestyles have increased waste and emission of pollutants into aquatic environments (Staniskiene et al. 2006; Jha 2008). The contamination of these environments can have negative effects on aquatic life (e.g. impaired reproduction and reduced species diversity) and directly or indirectly affect human health and threaten food security (Jha op cit.).

The industrial area of Coatzacoalcos houses the largest petrochemical complex with importance to Mexico and Latin America; its overall production is approximately 1.6 billion tons/year of petrochemical products (Morales et al. 2006). Since the industrial complex's establishment in the 1960s, the Coatzacoalcos estuary has experienced rapid industrial development and rapid population growth; which, combined with other production activities like agriculture and livestock, have triggered a severe impact on aquatic ecosystems of the region, accentuated in recent

---

D. J. González-Mille · C. A. Ilizaliturri-Hernández ·  
G. Espinosa-Reyes · R. Costilla-Salazar · F. Díaz-Barriga ·  
J. Mejía-Saavedra (✉)  
Departamento de Toxicología Ambiental, Facultad de Medicina,  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Avenida Venustiano  
Carranza 2405, Col. Lomas Los Filtros, San Luis Potosí, SLP CP  
78210, México  
e-mail: jjesus@uaslp.mx

I. Ize-Lema  
Instituto Nacional de Ecología (INE), México, D.F. CP 04530,  
Mexico

decades (Bozada and Bejarano 2006). Currently, the lower Coatzacoalcos River basin is considered one of the most polluted sites in Mexico (Páez-Osuna et al. 1986; Espinosa-Reyes et al. 2010). Environmental studies in the area have reported the presence of hydrocarbons (Farrán et al. 1987), volatile organic compounds (Stringer et al. 2001), heavy metals (Rosales-Hoz and Carranza-Edwards 1998; Bahena-Manjarrez et al. 2002) and persistent organic compounds (Espinosa-Reyes et al. op cit).

Persistent organic pollutants (POPs) are ubiquitous compounds, which, due to their high lipophilicity and persistence, tend to accumulate in fatty tissue and biomagnify through food chains (Walker 2009). These pollutants have been linked to neurological, immunological, reproductive and genotoxic effects in biota and human populations, and for these reasons have been banned or restricted in many countries (Buccini 2003). In Mexico, most of the POPs have been banned and/or restricted since 1991, however there are some studies demonstrating their presence and bioaccumulation, as well as their effects on Mexican ecosystems (Trejo-Acevedo et al. 2009; Espinosa-Reyes et al. op cit).

The main potential sources of the POPs found in the Coatzacoalcos region are as follows: HCB is an insecticide that was used mainly for seed treatment; however, it was also used as a flame retardant in plastics, rubber and paints (Ritter et al. 1995; INE-SEMARNAT 2003; Zitko 2003b). Today, it is mainly a by-product of chlorinated compounds (e.g. vinyl chloride and chlorinated benzenes), solvents, pesticides production and the burning of municipal waste (Ritter et al. op cit; INE-SEMARNAT op cit; Zitko op cit). Hexachlorocyclohexane (HCH) is an insecticide that theoretically consists of eight isomers, of which the most abundant are  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ ; though only the  $\gamma$ -isomer (commonly called lindane) has insecticidal properties (INE 2004; CEC 2006). Currently, the permitted uses of lindane in Mexico are for plant and seed treatments, ectoparasite control in livestock and for pediculosis and scabies in public health (INE op cit.; CEC op cit.). The DDT is an insecticide that was used to control agricultural pests and in health campaigns against malaria (Díaz-Barriga et al. 2003). PCBs are industrial chemicals that had a wide variety of applications mainly in the electricity industry in transformers and capacitors (Ritter et al. op cit.; Nie et al. 2006). Mirex is an insecticide; however, it has had a wide industrial application as a flame retardant in rubber, paper, plastic and non-flammable paints (Ritter et al. op cit.; Zitko 2003a).

Traditional approaches for assessing ecosystem health applied in the area of Coatzacoalcos have placed greater emphasis on abiotic components (soil, sediment and water), but these have been insufficient and lack informa-

tion about the possible effects on aquatic organisms. Exposure to complex mixtures of pollutants, especially when they occur at low concentrations, do not always result in lethal effects on organisms, but subtle sublethal effects may occur at the molecular, biochemical and physiological levels and can influence the long-term survival of populations (Triebkorn et al. 2001). The assessment of sublethal effects on biological systems as targets of toxic action coupled with the analysis of environmental samples can provide more information about the health of ecosystems. Their relationship may be useful as integrated environmental diagnostic tools and in developing control strategies and pollution prevention measures (Pathiratne et al. 2008). The use of fish in freshwater and marine environments as bioindicators of environmental pollution has become more common in aquatic monitoring programs since the practice has proved useful in identifying environmental problems, mainly on the evaluation of the presence of potentially teratogenic and carcinogenic toxins (Simoniello et al. 2009). Genotoxicity and endocrine disruption are the most worrying effects for their ecological implications in aquatic ecosystems. Some environmental contaminants can affect the genetic material of wildlife species, thus various mechanisms and methods have been developed to assess exposure and to detect DNA damage (Nacci et al. 1996). Genotoxic compounds, such as As, Cd, PAHs, DDTs and lindane have been detected in the Coatzacoalcos region. Therefore, in the present study the use of the comet assay (single cell gel electrophoresis, SCGE) was considered as an integral biomarker to assess the effects of the mix of pollutants on the fish of the region.

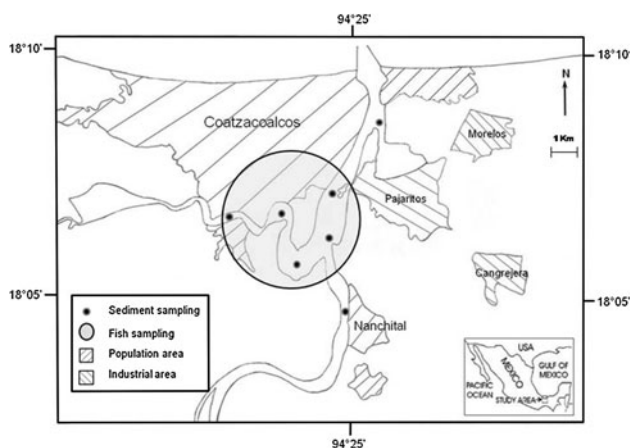
Recently, the comet assay has gained wide acceptance as an essential tool for genotoxicity assessment and biomonitoring studies due to: (1) sensitivity to detect low levels of DNA damage, (2) easy and rapid implementation, (3) flexibility, and (4) low cost (Lee and Steinert 2003; Collins et al. 2008). For these mentioned reasons, this assay has been widely used in various fish species in different aquatic environments and has been standardized for use in different tissues (blood, liver and gills), to study exposure to a variety of genotoxic compounds (Lee and Steinert op cit.; Dhawan et al. 2009).

The aim of this study was to determine the levels of POPs in sediment and fish muscle tissue from different trophic levels in downstream residents of Coatzacoalcos River, and their integration with sublethal effects to obtain a baseline of the ecological condition of this region. Persistent organic pollutants were analyzed in environmental and biological samples, and DNA damage was assessed through the comet assay in whole blood (on a mixture of erythrocytes and lymphocytes) as a biological indicator of stress.

## Materials and methods

### Study area and sampling sites

The region of Coatzacoalcos is located in the southeastern state of Veracruz, Mexico in the municipality of the same name, at 18°8'56" N and 94°24'41" W. The average altitude is 14 m.a.s.l. The predominant climate is tropical rain [Am (i') gw"], the average annual temperature is 24.5°C and average annual rainfall is 2780.1 mm (García 2004). The main surface water body is the Coatzacoalcos River, which has an area of 322 km. It originates at more than 2000 m in elevation in the state of Oaxaca and over its course is fed by countless rivers (Jaltepec, Coachapa, Uxpanapa, Calzadas) and streams (Teapa, Tepeyac, San Francisco) whose inflows contribute to the discharge of pollutants (Páez-Osuna op cit.; Rosales-Hoz and Carranza-Edwards op cit.). The region is comprised of urban, industrial, livestock, riparian and wetland areas; however the main activity is chemical and petrochemical industry (Ruelas-Inzunza et al. 2007). In October 2006, seven sampling stations were established in the lower basin of the Coatzacoalcos River for sediment sampling. Because fish are organisms with a wide range of motion, specimens were caught in an area of approximately 8 km<sup>2</sup> (Fig. 1) where the sediment samples were collected. The selection of sampling sites was based on the wind direction, the location of the industrial zone and urban areas, and the influence of riparian systems as well as previous investigations within the area (Páez-Osuna op cit.; Rosales-Hoz and Carranza-Edwards op cit.; Stringer et al. op cit.; Bahena-Manjarrez op cit.).



**Fig. 1** Study area and location of sampling sites in the region of Coatzacoalcos, Ver

### Environmental and biological sampling

Surface sediment samples were collected from each of the seven stations. Sediment was taken directly from depth ( $\approx 1.5$ –2 m) in amber glass containers [previously cleaned with a solution of  $K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4 + H_2O$  (chromic mixture)] and samples were kept under refrigeration at 4°C until analysis. The fish were caught using traditional fishing gear (i.e. cast net) with the help of fishermen from the lowland river region. Thirty-one fish were captured from five species (*Centropomus parallelus*, *Mugil cephalus*, *Eugerres axillaris*, *Oreochromis* sp, and *Ariopsis felis*). The organisms were measured, weighed and sorted by species and feeding habits (Table 1). Immediately after capture, blood samples were obtained from the tail veins with previously heparinized syringes. The samples were stored at 4°C for transport and subsequent laboratory analysis. Dissection was performed on each of the specimens to extract the dorsolateral muscle tissue. The tissue was placed in amber glass containers (previously cleaned with chromic mixture) and frozen at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis.

### Analysis of POPs concentrations

The following compounds were evaluated in samples of sediment and fish tissue:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane (HCH), hexachlorobenzene (HCB), aldrin, dieldrin, mirex,  $\alpha$ -,  $\gamma$ -chlordane, oxychlordane, trans-, cis-nonachlor, heptachlor epoxide, p, p'-DDT, p, p'-DDE and polychlorinated biphenyls (PCBs). Sediments were analyzed for 41 congeners of PCBs (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 and 209). Only 14 congeners (IUPAC No 28, 52, 99, 101, 105, 118, 128, 138, 153, 156, 187, 180, 183, and 170) were analyzed in fish tissues.

### Sediment extraction

The POPs in sediment were analyzed according to methods 8081A and 8270C of the USEPA (1996a, b) with slight modifications. Sediment extraction was conducted in a microwave (CEM-MARS X) by placing the sediment sample (1 g) in a Teflon vessel, adding 14 ml of dichloromethane. After extraction the samples were evaporated to 0.2 ml with a stream of nitrogen in an evaporator at 37°C. During the process, the samples were re-suspended to 2 ml with hexane. Finally, the extract was passed through a florisil column eluting with diethylether (6%) for cleaning. The extract was concentrated to a volume of 1 ml by a stream of nitrogen. Endrin-C<sub>13</sub> and PCB 14-C<sub>13</sub> were used as internal standards and were added to all samples. The

**Table 1** Scientific names and feeding habits of the species evaluated

Scientific name (acronym)	Common name	<i>n</i>	Feeding habits
<i>Centropomus parallelus</i> (Cepa)	Chucumite (Fat snook)	9	Carnivore: feeds mainly on benthic crustaceans, fish and shellfish
<i>Mugil cephalus</i> (Muce)	Lisa (Flathead mullet)	7	Detritivore: feeds mainly on detritus and occasionally benthic organisms
<i>Ariopsis felis</i> (Arfe)	Bagre (Hardhead sea catfish)	3	Detritivore: usually feeds on detritus and organic matter
<i>Eugerres axillaris</i> (Euax)	Mojarra rayada (Black axillary mojarra)	7	Omnivore: feeds on small benthic invertebrates, algae and small fish
<i>Oreochromis</i> sp (Orsp)	Tilapia (Tilapia)	5	Omnivore: usually feeds on phytoplankton and zooplankton. Juvenile stages occasionally feeds on copepods and cladocerans

reference standard certificate (CE-2 “A Blended Lake Ontario Sediment for Toxic Organics”) of the National Water Research Institute of Canada was also used. All reagents used were analytical grade.

#### Tissue extraction

The method of extraction, separation and cleaning of muscle tissue was carried out according to the method established by Jensen et al. (2003) with slight modifications. Ten grams of muscle tissue were homogenized and extracted with 25 ml of isopropanol, 10 ml of diethylether and 8 ml of a mixture hexane:diethylether (9:1 v/v). The extract was filtered and used for the gravimetric determination of total lipids. Samples were subsequently evaporated at 37°C to a volume of 0.5 ml. For cleaning, the samples were passed through a column of silica gel where they were eluted with 8 ml of a mixture of methylene:hexane (3:1 v/v) and concentrated to 100 µl. The endrin-C<sub>13</sub> and PCB 14-C<sub>13</sub> were used as internal standards and were added to all samples. All reagents used were analytical grade.

#### Chromatographic analysis

The chromatographic method for sediment and tissue samples was carried out according to that reported by Trejo-Acevedo et al. (2009). Once the corresponding extraction was performed, 1 µl of extract was injected into a gas chromatograph (HP 6890), coupled to a mass spectrophotometer (HP 5973) with a HP5-MS column (60 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness). The temperature program used was: initial 100°C (2 min) and final 310°C (at rates of increase in temperature: 20°C/min to 200°C, 10°C/min to 245°C, 4°C/min to 280°C and 30°C/min to 310°C for 6 min). The carrier gas used was helium at a linear velocity of 1 ml/min. The detection limit for POPs was 0.6 to 2 µg/l for sediment and 0.3 µg/l in tissue.

#### Comet assay (SCGE)

The comet assay was performed in four of the five species collected (*Centropomus parallelus* *n* = 7, *Mugil cephalus* *n* = 8, *n* = 5 *Oreochromis* sp, *Ariopsis felis* *n* = 2) according to that described by Singh et al. (1988) with slight modifications. An aliquot of 5 µl of whole blood was diluted in 240 µl agarose of low melting point (37°C). The slides were prepared using 15 µl of the cell suspension and 225 µl of agarose of low melting point in a pre-developed layer of regular agarose to 0.5%. Subsequently the slides were incubated in lysis buffer [(consisting of 10 mM Tris-HCl, 2.5 M NaCl, and 100 mM EDTA, 0.2 M NaOH, adjusted to pH 10) to which 10% DMSO and 1% Triton X-100 were added before use]. Samples were incubated for 1 week in darkness at a temperature of 8°C. After incubation, the slides were placed in an alkaline buffer (10 N NaOH and 200 mM EDTA, adjusted to pH > 13) for 5 min to unfold the DNA. Horizontal electrophoresis was immediately performed for 10 min at 25 V and 300 mA, then were neutralized with Tris (0.4 M) to pH 7.5 and fixed with ethanol. The slides were then stained with 20 µl of ethidium bromide (0.05 mM) for observation in a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E400) at a magnification of 200×. We measured the olive tail moment [(tail mean-head mean) \* tail% DNA/100] and tail length (tail extent) of 100 cells (50 in the sample and 50 in the reply) per individual with a pictures software analyzer (Komet 4.0, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK).

#### Hazard quotient

A comparison of concentrations with international guidelines [Canadian Sediment Quality Guidelines for the protection of aquatic life (CSQG) and National Oceanic and Atmospheric Administration-Screening quick (NOAA)] is made by estimating hazard quotient (HQ) of each one of the compounds recorded in the sediment according to the

formula:  $HQ = C_e/C_b$ , where  $C_e$  is the concentration of exposure and  $C_b$  the concentration of reference (Sutter 2007).

Statistical analysis

The data are reported as the mean, standard deviation and range. Concentrations of PCB congeners were summed to obtain the total of these compounds ( $\Sigma$ PCB). The concentrations in tissues were calculated on fresh weight (fw) and standardized by lipid content (lw). All samples with undetectable values of POPs were assigned half the detection limit (0.30  $\mu$ g/l), when the number of data was at least half of the n for the variable (Naso et al. 2003).

Analysis of similarity (ANOSIM, Clarke and Warwick 2001) followed by pairwise comparisons between species of fish and their feeding habits was used to investigate the differences in POPs content in tissue. An “R” value close to +1 indicates that there are clear differences in patterns among the groups tested. A value near zero means that the distribution of patterns is as similar among the groups as within the groups. The significance level of “R” was calculated by permutation test and was considered statistically significant at  $p < 0.05$ . When pattern differences were identified, the similarity percentage (SIMPER) subroutine was used to identify which pollutants contributed the most to the observed differences. Non-metric multi-dimensional scaling plots (nMDS, Kruskal 1964) were constructed to display clustering patterns among species of fish and their feeding habits. Multivariate analysis was performed with a nonparametric statistical software PRIMER V.6.1.11 (PRIMER-E Ltd, UK 2006; see also Baldwin and Howitt 2007, for application of statistical techniques in non-metric analysis biomarkers of exposure and environmental pollutants).

The differences in DNA damage (OTM and TL) were evaluated with a Kruskal–Wallis test at a level of statistical significance of  $p < 0.05$ , with STATISTICA Data Analyzer software (version 6, StatSoft Inc 2001).

Results and discussion

Concentrations of POPs in sediment

Of the 57 compounds evaluated, only 27 were detected in the sediment samples (HCB,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -HCH, DDT, DDE, mirex and 20 PCBs congeners) collected from the study area (Table 2). PCBs congeners detected were 52, 70, 74, 82, 87, 99, 101, 105, 110, 118, 128, 132, 138, 149, 151, 153, 156, 158, 170 and 180. Except for mirex, concentrations of pollutants recorded in the samples exceeded the values of environmental protection established by

Table 2 Concentrations of POPs (ng/g, dw) in sediment of the area evaluated

	Mean	DS	Range	Reference level
HCB	267.0	256.2	(33.4–756.6)	20 <sup>a</sup>
$\alpha$ -HCH	327.3	141.6	(237.9–643.8)	6 <sup>a</sup>
$\beta$ -HCH	43.3	15.0	(33.1–65.0)	5 <sup>a</sup>
$\gamma$ -HCH (Lindane)	43.3	22.6	(27.5–86.4)	0.94 <sup>b</sup>
DDT	64.4	30.0	(43.2–85.6)	1.42 <sup>b</sup>
DDE	8.9	8.5	(3.9–18.7)	1.19 <sup>b</sup>
Mirex	2.9 <sup>c</sup>	–	–	7 <sup>a</sup>
$\Sigma$ PCBs	2212.3	4666.3	(0.0–12702.6)	34.1 <sup>b</sup>
$\Sigma$ POPs	2897.2	4652.4	(482.3–13289.3)	–

<sup>a</sup> NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration Screening quick)

<sup>b</sup> CSQG (Canadian Sediment Quality Guidelines for the protection of aquatic life)

<sup>c</sup> The value in mirex no standard deviation or range it was only detected in a sample

international guidelines [(CSQG) and (NOAA)]. The hazard quotient (HQ) was 13.3 for HCB, 54.4 for  $\alpha$ -HCH, 8.6 for  $\beta$ -HCH, 46.0 for  $\gamma$ -HCH, 45.3 for DDT, 7.5 for DDE and 64.8 for  $\Sigma$ PCBs, showing a high potential risk to aquatic life in the region. In addition, these values may underestimate the actual risk because they are calculated according to the evaluation of each separate compound, and does not consider possible interactions between various pollutants assessed and those reported in other studies.

HCHs concentrations (Table 2) were detected in the following proportions: 79%  $\alpha$ -HCH, 10.4%  $\beta$ -HCH and 10.4%  $\gamma$ -HCH, which roughly corresponds to the formulation of technical HCH [ $\alpha$ -HCH 60–70%,  $\beta$ -HCH 5–12% and  $\gamma$ -HCH 10–15%] (Yim et al. 2005; CEC 2006). Lindane has been widely used for parasite control in cattle in Mexico (INE op cit.). Coatzacoalcos and some municipalities located upstream (Minatitlán and Hidalgotitlán), have considerable livestock [with 28,455, 128,930 and 312,900 cattle “heads” respectively] (INEGI 2008). Therefore there is probably a significant contribution of the different isomers of HCH through runoff into the Coatzacoalcos River and then in downstream flow (toward the study area).

The presence of HCB and mirex in the area of Coatzacoalcos (Table 2) is probably also due to their use as pesticides, flame retardants and major industrial activity in Coatzacoalcos. Moreover HCB can also be generated as a byproduct in the production of vinyl chloride monomer which is produced in the region (INE-SEMARNAT op cit.; Bozada and Bejarano op cit.). With regard to PCBs (Table 2) it was not possible to identify a specific source in the region, however a source is likely to exist in the transformer storage area in oils containing PCBs.



The region of Coatzacoalcos is located in a malaria endemic area; therefore, DDT was applied in large quantities in campaigns to eradicate the vector for this illness. In Mexico, DDT was applied until the year 2000 (ISAT 2002), so DDT found in the area (Table 2) is probably residual DDT. However, the ratio DDT/DDE (7.6) suggests a current use. This could be due to a dynamic ecosystem and the constant dredging that is performed in the riverbed, causing re-suspension of sediments, in addition to a possible clandestine application of DDT which has been reported by some authors (Alegria et al. 2000).

The amount and presence of various POPs in sediment is highly variable, due to the inherent dynamics of the river (temperature, salinity, currents, etc.), characteristics of the sediment type (particle size, organic matter content, etc.), type of flora and fauna, and human activities.

### POPs concentrations in fish

The concentrations of HCB,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -HCH, DDT, DDE, mirex and  $\Sigma$ PCBs (52, 101, 105, 118, 138, 153) in fish muscle samples are shown in Table 3. The highest concentrations recorded were those of  $\beta$ -HCH,  $\alpha$ -HCH and mirex. HCB was detected in 26% of the samples and only in the species *Mugil cephalus*. The  $\gamma$ -HCH and DDT were recorded in 32% and 10% of the samples, respectively.  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH, DDE, mirex and PCBs were detected in 100% of the samples. A larger number of compounds were found in *Ariopsis felis* and *Eugerres axillaris* (7 and 6

respectively); however the highest concentrations were found in *Eugerres axillaris*. According to these results the concentrations of POPs in muscle tissue by species decreases in the order  $\beta$ -HCH >  $\alpha$ -HCH > mirex > DDE >  $\Sigma$ PCBs >  $\gamma$ -HCH > DDT > HCB.

Figure 2a shows the organization diagram of the tissue samples by species. There is a difference between the concentrations of POPs in the species tested. These differences were corroborated by the ANOSIM (Global R = 0.34,  $p < 0.001$ ). Table 4 shows the comparison of pairs of species and pollutant contributions (in order of importance showing at least 60% of dissimilarity) in the degree of dissimilarity according to the SIMPER analysis. These results show a high degree of dissimilarity (79–99%), with the exception of *Oreochromis* sp and *Centropomus parallelus* in which no differences were found. The differences between the species tested are primarily due to the body loads of various POPs evaluated. *Ariopsis felis* recorded the highest concentrations of PCBs and DDT. *Mugil cephalus* is the only species in which HCB was detected and presented the highest concentrations of DDE. *Eugerres axillaris* showed the highest concentrations of lindane and  $\alpha$ ,  $\beta$ -HCH. Finally, *Oreochromis* sp. had the lowest body loads of POPs with regard to other species.

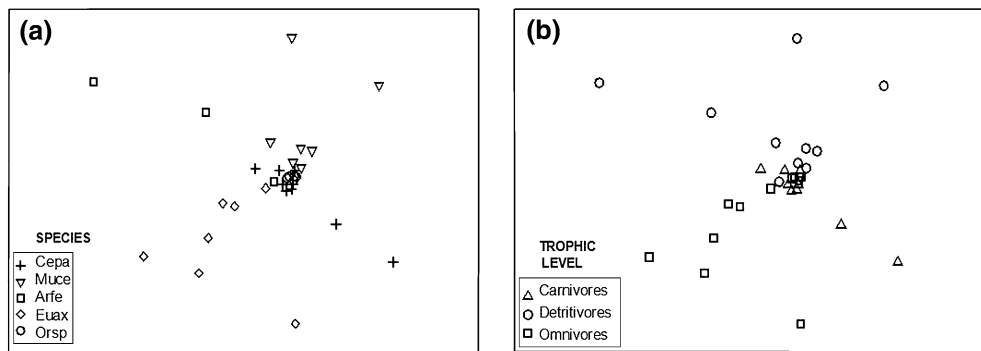
The classification of the species assessed by feeding habits included: carnivores: *Centropomus parallelus*, detritivores: *Mugil cephalus* and *Ariopsis felis*, omnivores: *Oreochromis* sp and *Eugerres axillaris*. Species with the greater number of contaminants found were detritivores,

**Table 3** Concentrations of POPs (ng/g lipid) in fish muscle of species collected in Coatzacoalcos, Veracruz

	HCB	$\alpha$ -HCH	$\beta$ -HCH	$\gamma$ -HCH	DDT	DDE	Mirex	$\Sigma$ PCBs	$\Sigma$ POPs
Cepa (n = 9)	N.D.	157.8 (2.1–735.5)	11.2 (1.8–64.5)	N.D.	N.D.	8.4 (1.9–26.2)	38.6 (6.9–75.3)	11.4 (1.8–45.7)	239.4 (53.3–844.7)
Muce (n = 7)	7.2 (2.7–19.4)	24.2 (7.7–43.9)	17.4 (1.7–91.5)	N.D.	N.D.	28.2 (7.4–78.8)	39.7 (10.7–56.6)	7.9 (1.0–36.9)	137.7 (65.1–211.4)
Euax (n = 7)	N.D.	79.9 (4.9–300.6)	315.0 (2.3–916.8)	18.1 (2.3–51.6)	N.D.	16.3 (3.6–27.5)	124.0 (18.2–218.7)	25.9 (15.6–48.0)	582.6 (139.3–1139.3)
Orsp (n = 5)	N.D.	27.7 (23.2–36.4)	3.1 (1.0–6.9)	N.D.	N.D.	14.9 (10.2–182)	37.9 (21.1–59.2)	2.3 (1.0–5.5)	88.7 (62.4–119.3)
Arfe (n = 3)	N.D.	32.6 (26.1–362)	2.6 (1.1–3.8)	5.8 (3.6–10.1)	8.8 (3.6–12.6)	13.3 (3.6–23.7)	61.0 (52.2–72.4)	45.8 (9.9–103.5)	166.0 (109.3–227.1)
All fishes (n = 31)	7.2 (N.D.–19.4)	76.9 (2.1–735.5)	79.0 (1.0–916.8)	14.4 (N.D.–51.6)	8.8 (N.D.–12.6)	16.2 (1.9–78.8)	60.2 (6.9–218.7)	15.8 (1.0–103.5)	262.5 (53.3–1139.3)

Values represent the mean, standard deviation and (range). Cepa: *Centropomus parallelus*, Muce: *Mugil cephalus*, Euax: *Eugerres axillaris*, Orsp: *Oreochromis* sp, Arfe: *Ariopsis felis*. N.D.: non detected

**Fig. 2** MDS of the distribution of contaminants in fish tissue by species (a) and feeding habit (b)



**Table 4** ANOSIM for the comparison of contaminants in fish tissue by species and SIMPER analysis showing the degree of dissimilarity

	Cepa	Muce	Euax	Orsp
Muce	0.288 (97.2%)* HCB, DDE, $\alpha$ -HCH, $\Sigma$ PCBs			
Euax	0.481 (89.5%)* $\gamma$ -HCH, mirex, $\beta$ -HCH, $\alpha$ -HCH	0.517 (79.0%)* HCB, $\gamma$ -HCH, $\beta$ -HCH, mirex		
Orsp	–	0.241 (99.5%)* HCB, DDE, $\Sigma$ PCBs, mirex	0.406 (94.5%)* $\beta$ -HCH, $\gamma$ -HCH, mirex, $\Sigma$ PCBs	
Arfe	0.495 (94.7%)* DDT, $\Sigma$ PCBs, $\alpha$ -HCH, DDE	0.548 (95.9%)* DDT, $\Sigma$ PCBs, HCB, DDE	0.488 (84.9%)* DDT, $\Sigma$ PCBs, $\beta$ -HCH, mirex	0.744 (98.2%)* DDT, $\Sigma$ PCBs, $\gamma$ -HCH, mirex

Values represent the R, (% contribution) and the contaminants that contribute to the dissimilarity

\*  $p < 0.05$

**Table 5** Concentrations of POPs (ng/g lipid) in fish muscle of species collected in Coatzacoalcos, Veracruz by feeding habits

	HCB	$\alpha$ -HCH	$\beta$ -HCH	$\gamma$ -HCH	DDT	DDE	Mirex	$\Sigma$ PCBs	$\Sigma$ POPs
Omnivores		58.1	185.0	18.1		15.8	88.1	16.1	376.8
(n = 12)	N.D.	79.2 (4.9–300.6)	269.4 (1.0–916.8)	17.8 (2.3–51.6)	N.D.	6.7 (3.6–27.5)	60.6 (18.2–218.7)	14.0 (1.0–48.0)	324.6 (62.4–1139.3)
Carnivores		157.8	11.2			8.4	38.6	11.4	239.4
(n = 9)	N.D.	252.8 (2.1–735.5)	20.1 (1.8–64.5)	N.D.	N.D.	8.9 (1.9–26.2)	23.8 (6.9–75.3)	13.8 (1.8–45.7)	257.9 (53.3–844.7)
Detritivores	7.2	26.7	13.0	5.8	8.8	23.8	46.1	19.3	146.2
(n = 10)	5.7 (N.D.–19.4)	12.9 (7.7–43.9)	28.0 (1.1–91.5)	3.7 (N.D.–10.1)	4.6 (N.D.–12.6)	20.9 (3.6–78.8)	19.1 (10.7–72.4)	31.8 (1.0–103.5)	47.7 (65.1–227.1)

Values represent the mean, standard deviation and (range). Carnivores: *Centropomus parallelus*, detritivores: *Mugil cephalus* and *Ariopsis felis*, omnivores: *Oreochromis sp* and *Eugerres axillaris*. N.D.: non detected

followed by omnivores and finally the carnivores (Table 5). HCB and DDT were detected only in the detritivores species. For detritivores, the contaminants detected and their order of concentration were mirex >  $\alpha$ -HCH > DDE >  $\Sigma$ PCBs >  $\beta$ -HCH > HCB >  $\gamma$ -HCH and DDT. In omnivores were  $\beta$ -HCH > mirex >  $\alpha$ -HCH >  $\Sigma$ PCBs > DDE >  $\gamma$ -HCH. In the carnivores:  $\alpha$ -HCH > mirex >  $\Sigma$ PCBs >  $\beta$ -HCH > DDE.

Figure 2b shows the organization diagram by trophic levels that demonstrates the body loads of the three groups (carnivores, detritivores and omnivores). Although there is some overlap, the test suggests barely differences between

them (ANOSIM global R = 0.11,  $p < 0.01$ ). The results of the ANOSIM and SIMPER analysis of comparisons between pairs of types of feeding habits and the contributions of pollutants, show that between omnivores and detritivores (R = 0.16,  $p < 0.05$ ), 60.8% of dissimilarity is given by HCB, DDT,  $\beta$ -HCH and  $\gamma$ -HCH. Among the group of carnivores and detritivores (R = 0.13,  $p < 0.05$ ), 80.6% of dissimilarity is attributed to HCB, DDE,  $\alpha$ -HCH and DDT. Detritivores are the only ones that have concentrations of HCB and DDT and in turn have the lowest concentrations of HCHs and higher DDE. In carnivores, highest body loads are of  $\alpha$ -HCH.

No significant differences were found between carnivores and omnivores.

Analysis of species by feeding habit showed that concentrations of  $\beta$ -HCH and  $\alpha$ -HCH were the most abundant, consistent with that recorded by Yim et al. (2005) in other fish species.  $\beta$ -HCH and  $\alpha$ -HCH have a higher bioconcentration factor (log BCF 2.8 and 2.5 respectively) in aquatic animals and are more persistent than  $\gamma$ -HCH (log BCF 1.2) (Willett et al. 1998). In general, the sediment samples has a higher proportion of  $\alpha$ -HCH (79%); however, concentrations of  $\beta$ -HCH and  $\alpha$ -HCH in tissues were similar, which may be due to  $\alpha$ -HCH volatility (Henry's Law constant of  $6.68 \times 10^{-6}$  atm-cu m/mole) and degradation in the environment, which can cause low persistence (Yim op cit). Another possible explanation is that the  $\alpha$ -HCH is metabolized and excreted more rapidly than  $\beta$ -HCH (Takazawa et al. 2005).

DDT was detected only in *Ariopsis felis* while DDE was detected in all species. The highest concentrations were recorded in detritivores fish. As mentioned, DDT was widely used in Mexico for the control of malaria; however, its use was eliminated due to its toxic effects. Chemical and biological processes transform DDT into DDE and dichlorodiphenyldichloroethane (DDD). DDE in particular has been commonly recorded in biota (Takazawa et al. op cit.). Therefore, it could be interpreted that the DDT to which fish are exposed to in Coatzacoalcos is residual DDT, and that fish in the area of Coatzacoalcos are mainly exposed to products of degradation.

Concentrations and distribution of POPs in fish is controlled by many intrinsic factors (species, sex, genetics, developmental status, weight, length, age, health status, metabolic rate and elimination, body lipid content, feeding habits, etc.) as well as extrinsic factors (season, temperature and water quality) that may influence the bioconcentration, bioaccumulation and biomagnification of these compounds (Ashley et al. 2000; Yim et al. op cit.). The differences observed between the levels of pollutants could be explained by variability among individuals of the same species, as well as feeding habits. The differences in

metabolic capacity and habitat characteristics between species should also be considered (Naso et al. op cit.).

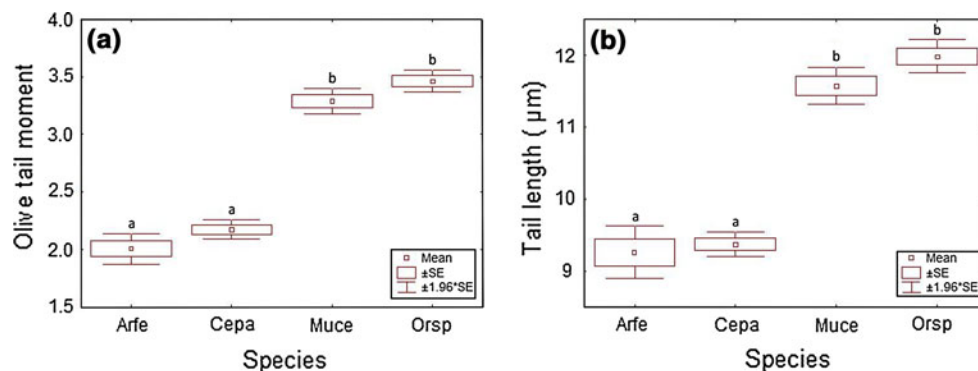
Van der Oost et al. (1996) recorded levels of  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -HCH, PCBs, DDT and DDE in fish from industrial areas of Amsterdam (73.5, 13.2, 18.7, 12065, 701.25, 1450 ng/g lipid respectively). These levels are lower than those detected in this study. Similarly Zhou and Wong (2004) have reported levels of  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -HCH for agricultural regions of China (0.2, 4.5, <0.01 ng/g lipid respectively) which are also lower than those recorded in fish from Coatzacoalcos.

#### DNA fragmentation

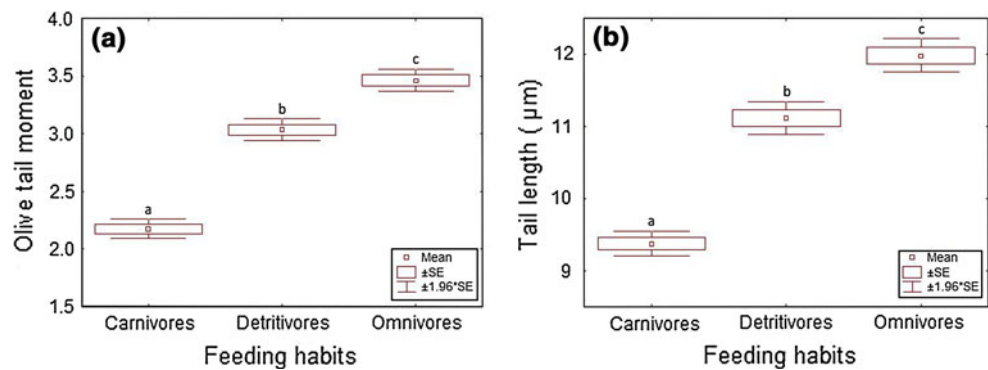
The species with lower DNA damage were *Ariopsis felis* [OTM 2.0 (0.12–5.5) and TL 9.26  $\mu$ m (3.6–17.2)] and *Centropomus parallelus* [OTM 2.2 (0.6–7.3) and TL 9.4  $\mu$ m (2.8–21.8)] compared with *Mugil cephalus* [OTM 3.3 (0.01–12.6) and TL 11.6  $\mu$ m (1.0–35.0)] and *Oreochromis* sp [OTM 3.5 (0.2–8.1) and TL 11.9  $\mu$ m (5.2–23.2)] exhibiting greater damage ( $p < 0.01$ ) (Fig. 3a and b). Comparison based on feeding habits (Fig. 4a and b) showed that carnivores species had less DNA damage, while omnivores showed greater DNA damage ( $p < 0.01$ ). This can mainly be explained by the different routes of exposure, due to the fact that detritivores organisms are in direct contact with contaminants attached to sediment particles, and omnivores organisms can incorporate multiple bioavailable pollutants from various sources due to their food preferences, which are even more limited in carnivores organisms. It should be noted that the observed effect on the species tested in this study is not attributable solely to POPs exposure, but may be due to other contaminants in the site which were not evaluated (e.g. metals and PAHs). The comet assay is a comprehensive tool that allows the assessment of exposure to a mixture of genotoxic pollutants.

The measurement of the comet assay was carried out through various parameters (score damage, OTM, TL, among others) and represents one of its major disadvantages in that there is no standardized way to measure and

**Fig. 3** Olive tail moment (a) and Tail length (b) in the species *Ariopsis felis* (Arfe), *Centropomus parallelus* (Cepa), *Mugil cephalus* (Muce) and *Oreochromis* sp (Orsp) in the area of Coatzacoalcos, Veracruz. Different letters indicate significant differences  $p < 0.01$



**Fig. 4** Olive tail moment (a) and Tail length (b) in the species evaluated by feeding habit. Carnivores: *Centropomus parallelus* ( $n = 7$ ); detritivores: *Mugil cephalus* and *Ariopsis felis* ( $n = 10$ ); omnivores: *Oreochromis* sp ( $n = 5$ ). Different letters indicate significant differences  $p < 0.01$



report (Kumaravel et al. 2009), which limits comparison with other studies. This paper presents the olive tail moment (OTM) and tail length (TL) data because they have shown to be the most useful parameters for assessing DNA damage. Russo et al. (2004) conducted a study which compared the DNA damage in fish from a site contaminated with a mixture of genotoxic compounds (Rio Sarno, TL  $\approx 8 \mu\text{m}$ ) and a reference site (Lake Astroni, TL  $\approx 3 \mu\text{m}$ ). DNA damage levels recorded in the Coatzacoalcos River fish (TL =  $10.4 \pm 1.3 \mu\text{m}$ ) are similar or higher than those reported by these authors.

DNA damage recorded in the fish species of the lower basin of the Coatzacoalcos River is evidence of genotoxic pollutant exposure. This may reflect the degree of environmental stress of aquatic organisms in the region. This is particularly important because the DNA damage is produced in both somatic and germ cells. If not repaired, or if repaired insufficiently, the damage will be reflected in both the health of the organism and in its reproduction (Jha op cit.). Consequently, this could lead to long-term adverse effects on other organizational levels, which should be evaluated in further studies in the region.

## Conclusions

The results of this study show the importance of determining the presence of contaminants in the environment, its bioaccumulation in tissues and its effects on organisms exposed, through an integrated approach in assessing the effects of pollution on the environment.

The quantity and presence of various POPs in sediments found in the region are variable due to the inherent dynamics of the river. The concentrations of POPs in sediment exceed the levels established by international guidelines (CSQG and NOAA), representing a risk to aquatic organisms in the region of Coatzacoalcos, Veracruz.

It was shown that fish collected in the lower Coatzacoalcos River basin are exposed to POPs. All species assessed provide a source of food for the human

population, and for other wildlife species; therefore, the consumption of these fish species could represent an important route of exposure to POPs.

This study provides baseline data on the status of POPs pollution in the region of Coatzacoalcos, Veracruz. Given the magnitude of the exposure to POPs and other pollutants, further studies are needed for different organisms and in different environments. Further studies should particularly focus on the assessment of sublethal effects at the individual level and at different levels of biological organization caused by exposure to a mixture of pollutants, to monitor the health of biota in the region and to propose regulation measures and the control of discharges.

**Acknowledgments** This work was supported by a grant from the Dirección General de Investigación sobre la Contaminación Urbana y Regional del National Institute of Ecology (DGICUR-INE) [No. de convenio INE/AI-047/2007], SEMARNAT and from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico, Conacyt-SEMARNAT 2004-C01-009. We thank the Veracruz University campus Coatzacoalcos. We also thanks to Biol. Alejandra Guerra of Centro Acuicola “El Peaje” of Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA) by the donation of fish for standardization of the comet assay. Special thank to Biol. Susan Quackenbush for English language editing of the manuscript.

## References

- Alegria HA, Bidleman TF, Shaw TJ (2000) Organochlorine pesticides in ambient air of Belize, Central America. *Environ Sci Technol* 34:1953–1958
- Ashley JT, Secor DH, Zlokovitz E, Wales SQ, Baker JE (2000) Linking habitat use of Hudson river striped bass to the accumulation of polychlorinated biphenyls congener. *Environ Sci Technol* 34:1023–1029
- 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
- Baldwin DS, Howitt JA (2007) Baseline assessment of metals and hydrocarbons in the sediments of Lake Mulwala, Australia. *Lakes Reserv Res Manag* 12:167–174. doi:10.1111/j.1440-1770.2007.00331.x
- Bozada RL, Bejarano GF (2006) Los contaminantes orgánicos persistentes en el istmo mexicano. *International POPs Elimination*

- Network (IPEN), Mexico, 79 pp. Available in: <http://noalaincineracion.org/wp-content/uploads/ReportePOPSIstmo.pdf>. Accessed March 2010
- 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. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 13–30
- CEC (2006) The North American Regional Action Plan (NARAP) on lindane and other hexachlorocyclohexane (HCH) isomers. Commission for Environmental Cooperation (CEC), 51 pp. Available in: [http://www.cec.org/Storage/36/2797\\_NARAP\\_on\\_Lindane\\_and\\_Other\\_Hexachlorocyclohexane\\_Isomers.pdf](http://www.cec.org/Storage/36/2797_NARAP_on_Lindane_and_Other_Hexachlorocyclohexane_Isomers.pdf). Accessed March 2010
- Clarke KR, Warwick RM (2001) Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd edn. PRIMER-E, Plymouth, p 172
- 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
- Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D (2009) Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol* 25:5–32. doi:10.1007/s10565-008-9072-z
- Díaz-Barriga F, Borja-Aburto V, Waliszewski S, Yáñez L (2003) DDT in Mexico. In: Fiedler H (ed) The handbook of environmental chemistry vol. 3, part O: persistent organic pollutants. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 371–388
- Espinosa-Reyes G, Ilizaliturri CA, González-Mille DJ, Costilla R, Díaz-Barriga F, Cuevas MC, Martínez MA, Mejía-Saavedra J (2010) DNA damage in earthworms (*Eisenia* spp.) as an indicator of environmental stress in the industrial zone of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *J Environ Sci Health Part A* 45:49–55. doi:10.1080/10934520903388731
- Farrán A, Grimalt J, Albaigés J, Botello AV, Macko SA (1987) Assessment of petroleum pollution in a Mexican river by molecular markers and carbon isotope ratios. *Mar Pollut Bull* 18:284–289
- García E (2004) Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, 4th edn. Offset Larios, México, p 218
- INE (2004) El lindano en México. Instituto Nacional de Ecología (INE), México, 67 pp. Available in: [http://www.ine.gob.mx/descargas/sqre/el\\_lindano\\_en\\_mexico.pdf](http://www.ine.gob.mx/descargas/sqre/el_lindano_en_mexico.pdf). Accessed March 2010
- INEGI (2008) Anuario estadístico de Veracruz de Ignacio de la Llave: ganadería. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Available in: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/sisnav/default.aspx?proy=aec&edi=2008&ent=30>. Accessed Sep 2009
- INE-SEMARNAT (2003) El hexaclorobenceno en perspectiva. Instituto Nacional de Ecología (INE), Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), México, 56 pp. Available in: [http://www.ine.gob.mx/descargas/sqre/informe\\_final\\_pni\\_hexaclorobenceno.pdf](http://www.ine.gob.mx/descargas/sqre/informe_final_pni_hexaclorobenceno.pdf). Accessed March 2010
- ISAT (2002) Diagnostico situacional del uso de DDT y el control de la malaria: informe regional para México y Centroamérica. Instituto de Salud, Ambiente y Trabajo (ISAT), México, 58 pp. Available in: [http://www.cec.org/Storage/44/3646\\_InfRegDDTb\\_ES\\_EN.pdf](http://www.cec.org/Storage/44/3646_InfRegDDTb_ES_EN.pdf). Accessed March 2010
- Jensen S, Hågberg L, Jörundsdóttir H, Odham G (2003) A quantitative lipid extraction method for residue analysis of fish involving nonhalogenated solvents. *J Agric Food Chem* 51:5607–5611
- Jha AN (2008) Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23:207–221. doi:10.1093/mutage/gen014
- Kruskal JB (1964) Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika* 29:1–27
- Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN (2009) Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol* 25:53–56. doi:10.1007/s10565-007-9043-9
- Lee RF, Steinert S (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res* 544:43–64
- Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME, Schettino T (2004) Biomarker application for the study of chemical contamination risk on marine organisms in the Taranto marine coastal area. *Chem Ecol* 20(Supplement 1):S333–S343. doi:10.1080/02757540310001629215
- 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
- Nacci DE, Cayulab S, Jackim E (1996) Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat Toxicol* 35:197–210
- Naso B, Perrone D, Ferrante MC, Zaccaroni A, Lucisano A (2003) Persistent organochlorine pollutants in liver of bird of different trophic levels from coastal areas of Campania, Italy. *Arch Environ Contam Toxicol* 45:407–414. doi:10.1007/s00244-0032201-z
- Nie XP, Lan CY, An TC, Li KB, Wong MH (2006) Distributions and congener patterns of PCBs in fish from major aquaculture areas in the Pearl River Delta, South China. *Hum Ecol Risk Assess* 12:363–373. doi:10.1080/10807030500537908
- Páez-Osuna F, Botello AV, Villanueva S (1986) Heavy metals in Coatzacoalcos estuary and Ostion lagoon, Mexico. *Mar Pollut Bull* 17:516–519
- Pathiratne A, Chandrasekara LWHU, De Seram PKC (2008) Effects of biological and technical factors on brain and muscle cholinesterases in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: implications for biomonitoring neurotoxic contaminations. *Arch Environ Contam Toxicol* 54:309–317. doi:10.1007/s00244-007-9025-1
- Ritter L, Solomon KR, Forget J, Stemeroff M, Leary CO (1995) An assessment report on DDT, aldrin, dieldrin, endrin, chlordane, heptachlor, hexachlorobenzene, mirex, toxaphene, polychlorinated biphenyls, dioxins and furans. The International Programme on Chemical Safety (IPCS), 43 pp. Available in: <http://www.chem.unep.ch/pops/ritter/en/ritteren.pdf>. Accessed March 2009
- Rosales-Hoz L, Carranza-Edwards A (1998) Heavy metals in sediments from Coatzacoalcos river, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol* 60:553–561
- Ruelas-Inzunza J, Gárate-Viera Y, Páez-Osuna F (2007) Lead in clams and fish of dietary importance from Coatzacoalcos estuary (Gulf of Mexico). *Bull Environ Contam Toxicol* 79:508–513. doi:10.1007/s00128-007-9285-5
- Russo C, Rocco L, Morescalchi MA, Stingo V (2004) Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol Environ Saf* 57:168–174. doi:10.1016/S0147-6513(03)00027-7
- Simoniello MF, Gigena F, Poletta G, Loteste A, Kleinsorge E, Campana M, Scagnetti J, Parma MJ (2009) Alkaline comet assay for genetic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bull Environ Contam Toxicol* 83:155–158. doi:10.1007/s00128-009-9771-z
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191
- Staniskiene B, Matosevicius P, Budreckiene R, Skibniewska KA (2006) Distribution of heavy metals in tissues of freshwater fish in Lithuania. *Pol J Environ Stud* 15:585–591

- Stringer R, Labunska I, Brigden K (2001) Organochlorine and heavy metal contaminants in the environment around the complejo petroquímicos Paharitos, Coatzacoalcos, Mexico. *Technique note Greenpeace Research Laboratories, University of Exeter, UK*, 60 pp
- Sutter GW II (2007) *Ecological risk assessment*, 2nd edn. CRC Press, Florida, p 643
- Takazawa Y, Kitamura K, Yoshikane M, Shibata Y, Morita M, Tanaka A (2005) Distribution patterns of hexachlorocyclohexanes and other organochlorine compounds in muscles of fish from a Japanese remote lake during 2002–2003. *Bull Environ Contam Toxicol* 74:652–659. doi:10.1007/s00128-005-0633-z
- 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
- Triebeskorn R, Böhmer J, Braunbeck T, Honnen W, Köhler H-R, Lehmann R et al (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. *J Aquat Ecosyst Stress Recovery (Formerly J Aquat Ecosyst Health)* 8:161–178
- 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
- Van der Oost R, Opperhuizen A, Satumalay K, Heida H, Vermeulen NP (1996) Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquat Toxicol* 35:21–46
- Walker CH (2009) *Organic pollutants: an ecotoxicological perspective*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, FL, p 408
- Willett KL, Ulrich EM, Hites RA (1998) Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environ Sci Technol* 32:2197–2207
- 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
- Zhou HY, Wong MH (2004) Screening of organochlorines in freshwater fish collected from the Pearl river delta, People's Republic of China. *Arch Environ Contam Toxicol* 46:106–113. doi:10.1007/s00244-003-2197-4
- Zitko V (2003a) Chlorinated pesticides: aldrin, DDT, endrin, dieldrin, mirex. In: Fiedler H (ed) *The handbook of environmental chemistry vol. 3, part O Persistent Organic Pollutants*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 47–90
- Zitko V (2003b) Hexachlorobenzene. In: Fiedler H (ed) *The handbook of environmental chemistry Vol. 3, Part O persistent organic pollutants*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 91–122



## PRODUCTOS GENERADOS DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN

### Artículos Científicos

**González-Mille Donaji J.**, Ilizaliturri-Hernández César A., Espinosa-Reyes Guillermo, Costilla-Salazar Rogelio, Díaz-Barriga Fernando, Ize-Lema Irina and Mejía-Saavedra Jesús. Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. [Publicado en línea en *Ecotoxicology*: DOI: 10.1007/s10646-010-0508-x].

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.

### Capítulos de libro

Díaz-Barriga F., Torres A. Mejía J., Espinosa-Reyes G., Ilizaliturri C., **González D.** Anexo 1: **Método para la elaboración de estudios de evaluación de 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.

Díaz-Barriga F., Torres A., Mejía J., Espinosa-Reyes G., Ilizaliturri C., **González D.** 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. (INE) México, Distrito Federal. 130 p. Disponible en línea: [http://www.ine.gob.mx/dgicur/sqre/descargas/2005\\_inf\\_final\\_met\\_integrada.pdf](http://www.ine.gob.mx/dgicur/sqre/descargas/2005_inf_final_met_integrada.pdf)

### **Informes Técnicos**

[2007] Espinosa-Reyes G., Ilizaliturri C., **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”**. Informe presentado al Instituto Nacional de Ecología.

[2007] Espinosa-Reyes G., Ilizaliturri C., **González-Mille D.J.**, Pelallo N.A., Costilla-Salazar R., Trejo A., Pérez-Maldonado I.N., Martínez A., Mejía Saavedra J. y Díaz-Barriga F. **“Guía de monitoreo y biomonitoreo, y del programa de monitoreo”, la cual forma parte del proyecto “Monitoreo ambiental, determinantes de la exposición y efectos de contaminantes críticos en humanos y biota en Coatzacoalcos, Veracruz”** (Número de convenio: A1-047). Informe presentado al Instituto Nacional de Ecología.





## ANEXO 1

### Características fisicoquímicas de los contaminantes orgánicos persistentes

Para entender el comportamiento de algunos contaminantes en el ambiente es necesario conocer aquellas características fisicoquímicas que podrían influir en los mecanismos de transporte y persistencia en el ambiente, para así poder inferir las rutas de exposición de los receptores (Cuadro 1). De forma general con estas características es posible inferir cierto comportamiento de estos compuestos, tales como volatilidad (presión de vapor y constante de la ley de Henry), persistencia en el ambiente (Koc), factibilidad de bioacumularse en cadena alimentaria (Kow).

A continuación se enlistan y describen de forma general y breve cada una de estas características:

1. *Presión de vapor*: es una medida de volatilidad de una sustancia química y es determinante de la velocidad de volatilización al aire desde suelo o cuerpos de agua. Aquellos compuestos químicos con una presión de vapor mayor a  $1.0 \times 10^{-3}$  mm Hg tienen un alto potencial de volatilizarse.
2. *Constante de la Ley de Henry*: con ella se puede conocer la tendencia de un contaminante a volatilizarse del agua o suelo. Cuando el contaminante tiene un alto valor de la constante ( $> 1 \times 10^{-3}$  atm<sup>-3</sup>/ mol) nos indica que tiene un potencial elevado para volatilizarse del suelo.
3. *Solubilidad en agua*: Cuando el contaminante tiene una baja solubilidad ( $10^{-3}$ - $10^{-5}$ ) en agua, este puede tener afinidad por el suelo y sedimentos, y por consiguiente podrá acumularse en ellos.



4.  $K_{oc}$  (Log coeficiente de adsorción): esta medida nos puede indicar la tendencia de un compuesto orgánico a ser adsorbido por suelos o sedimentos. Si el  $K_{oc}$  es alto (>5) el compuesto podrá adsorberse a suelo, sedimento, materia orgánica y biota.
5.  $K_{ow}$  (Log coeficiente de partición octanol-agua): Proporciona un valor de polaridad de un compuesto, que es utilizado para determinar si este puede distribuirse en tejido de grasa animal. Los plaguicidas con un  $K_{ow}$  (>5) pueden acumularse en tejido graso y bioacumularse a lo largo de la cadena alimenticia.

**Cuadro 1.** Características fisicoquímicas de los COP's registrados en sedimento y tejido en Coatzacoalcos, Ver.

Característica		HCB	$\alpha$ -HCH	$\beta$ -HCH	$\gamma$ -HCH	DDT	DDE	Mirex	PCB's
Propiedades que determinan los mecanismos de transporte ambiental	Presión de vapor	1.09 x 10 <sup>-5</sup> mm Hg a 20°C	4.5 x 10 <sup>-5</sup> mm Hg a 25°C	3.6 x 10 <sup>-7</sup> mm Hg a 20°C	4.2 x 10 <sup>-5</sup> mm Hg a 20°C	1.6 x 10 <sup>-7</sup> mm Hg a 20°C	6.0x 10 <sup>-6</sup> mm Hg a 25°C	3 x 10 <sup>-7</sup> mm Hg a 25°C	4.06 x10 <sup>-4</sup> - 6.7 x 10 <sup>-3</sup> mm Hg a 25°C
	Constante de ley de Henry	5.8 x 10 <sup>-4</sup> atm <sup>-3</sup> /mol a 20°C	6.86 x 10 <sup>-6</sup> atm <sup>-3</sup> /mol a 25°C	4.5 x 10 <sup>-7</sup> atm <sup>-3</sup> /mol a 20°C	3.5 x 10 <sup>-6</sup> atm <sup>-3</sup> /mol a 20°C	8.3 x 10 <sup>-6</sup> atm <sup>-3</sup> /mol a 20°C	2.1 x 10 <sup>-5</sup> atm <sup>-3</sup> /mol a 20°C	5.16 x 10 <sup>-4</sup> atm <sup>-3</sup> /mol a 25°C	2.9 x 10 <sup>-4</sup> - 3.5 x 10 <sup>-3</sup> atm <sup>-3</sup> /mol a 25°C
	Solubilidad en agua	0.006 mg/L a 20°C	10 mg/L a 25°C	5 mg/L a 28°C	7 mg/L a 25°C	0.025 mg/L a 25°C	0.12 mg/L a 25°C	0.60 mg/L a 25°C	0.24-0.42 mg/L a 25°C
	$K_{oc}$	3.59-6.08	3.57	3.57	3.0	5.18	4.7	3.76	
Bioacumulación	$K_{ow}$	5.73	3.8	3.78	3.73	6.91	6.51	5.28	4.7-5.6
	FBC	26-121	850	1100	1460	50000		3200-7300	
Persistencia	Vida Media	417-1250 días (aire)				4.2-12.5 días (aire)		4.2-12.5 días (aire)	4.2 días (aire)
		>3.4 años (agua)	54-56 días (suelo)	100-189 días (suelo)	62-107 días (suelo)	0.34-1.14 años (agua)	1-6 días (agua)	0.34-1.14 años (agua)	5.7 años (agua)
		>3.4 años (suelo)				1.1-3.4 años (suelo)		>3.4 años (suelo)	1.14 años (suelo)

$K_{oc}$ : Log coeficiente de adsorción;  $K_{ow}$ : Log coeficiente de partición octanol-agua; FBC Factor de bioconcentración.

Fuentes: ATSDR 1995, 2000, 2002a, 2002b, 2005



## ANEXO 2

### Métodos para análisis de biomarcadores de exposición

#### MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE COP'S EN SEDIMENTO Y TEJIDO

##### Extracción en sedimento

El proceso de extracción del sedimento se realiza por horno de microondas (CEM-MARS X) de acuerdo a los métodos 8081A y 8270C de la USEPA (1996a, b) con ligeras modificaciones. Se coloca un gramo de muestra en vasos de teflón y se añaden 14 mL de diclorometano, las condiciones del horno son temperatura de 120°C, 140psi de presión en un tiempo de 60 minutos. Después de la extracción las muestras se evaporan 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-suspenden a 2 mL con hexano. Finalmente, el extracto se pasa por una columna de fluorisil eluyendo con dietileter (6%) para su limpieza. El extracto se concentra a un volumen de 1 mL mediante una corriente de nitrógeno. El endrin-C<sub>13</sub> y el PCB 14-C<sub>13</sub> deben ser utilizados como estándares internos y adicionarse a todas las muestras. Se utiliza además un estándar de referencia certificado (EC-2 "A Lake Ontario Blended Sediment for Toxic Organics") del National Water Research Institute de Canadá.

##### Extracción en tejido

El método de extracción de COP's en tejido se basa en el método desarrollado y validado por Jensen *et al.*, (2003), el cual se divide en tres etapas:



- 1) extracción de los lípidos del tejido; 2) extracción de los analitos de los lípidos y
- 3) limpieza de la muestra.

#### Extracción de los lípidos del tejido.

Se pesan 10 gramos de la muestra que son colocados en un embudo de vidrio, con filtro de vidrio (embudo de separación de fondo plano No. 1). Se adiciona el estándar interno (PCB-141) y se procede a la primera extracción líquido-líquido adicionando 25 mL de isopropanol y 10 mL de dietileter. Enseguida la muestra se muele durante 1 minuto y se deja reposar otro minuto. Posteriormente se abre la llave de paso del embudo No.1 y el solvente es colectado en un segundo embudo (de vidrio sin filtro) que contiene 50 mL de  $H_3PO_4$  0.1 M disuelto en NaCl al 0.9 %. Se realiza una segunda extracción líquido-líquido del embudo No.1 adicionando 10 mL de isopropanol y 25 mL de una mezcla de hexano:dietileter (9:1), moler nuevamente por un minuto y reposar por otro minuto. El solvente es colectado en el embudo No. 2. Una tercera extracción se lleva a cabo añadiendo al embudo No. 1, 25 mL de hexano:dietileter (9:1), agitando con varilla de vidrio durante un minuto y dejar reposar por otro minuto más. Finalmente se permite que el solvente baje al embudo No. 2. El embudo No. 2 se agita suavemente durante un minuto y se deja reposar hasta obtener dos fases: la orgánica (superior) y la acuosa (inferior). La fase acuosa se transfiere a un vaso de precipitado. La fase orgánica se colecta en un vaso de precipitado de 100 mL, previamente pesado. La fase acuosa se transfiere de nueva cuenta al embudo No. 2 para realizar una segunda extracción con 10 mL de una mezcla de hexano:dietileter (9:1). Se agita suavemente y se deja reposar hasta obtener las dos fases. Se vuelve a descartar la fase acuosa (inferior) y nuevamente se colecta la fase orgánica (superior) al vaso de precipitado que contiene el material obtenido en la primera extracción.

Para determinar la cantidad de lípidos, se deja evaporar el solvente del vaso de precipitado que contiene las fases orgánicas (el vaso puede dejarse toda



la noche en una campana de extracción y al día siguiente, si aún no se evapora el solvente, puede colocarse en baño de agua a 37°C por períodos de 30 min hasta alcanzar un peso constante). Cuando el solvente se ha evaporado se determina entonces el peso y por diferencia de pesos se obtiene el peso de los lípidos.

#### Extracción de los analitos de los lípidos

Los lípidos se disuelven con 1 mL de hexano y son transferidos a un tubo de ensaye (tubo No. 1). El vaso donde estaban los lípidos se lava tres veces con hexano empleando 0.5 mL cada vez. Los lavados son transferidos al tubo No. 1. Al final se ajusta el volumen de hexano hasta tener una proporción de 1 mL de solvente por cada 100 mg de lípidos. Adicionar al tubo de ensaye, el mismo volumen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado que se haya adicionado de hexano y mezclar por inversión durante 2 minutos. Centrifugar a 3,000 rpm por 5 minutos. La fase orgánica (superior) se transfiere a un segundo tubo. La fase ácida (inferior) se lava con 3 mL de hexano, se agita por inversión durante dos minutos y se centrifuga a 3,000 rpm durante 5 minutos. La fase orgánica es transferida al segundo tubo. Las fases orgánicas colectadas en el segundo tubo son evaporadas hasta aproximadamente 0.5 mL empleando corriente de nitrógeno y calentamiento (37°C) para posteriormente realizar la limpieza.

#### Limpieza de la muestra.

Primero se realiza la activación de la sílica-gel, por lo que se coloca en una estufa a 280°C durante 24h, se deja enfriar a temperatura ambiente, se transfiere a un frasco de vidrio ámbar y se coloca en un desecador para conservar la sílica activada. Ésta debe usarse por un periodo de no más de 7 días. Posteriormente se preparan las columnas de la siguiente manera: en una pipeta Pasteur de punta larga se coloca un tapón de lana de vidrio silanizada, se agrega 0.1 g de una



mezcla de SiO<sub>2</sub>act:KOH 1M (2:1), 0.9 g de una mezcla de SiO<sub>2</sub>act:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (2:1) y 0.1 g de sulfato de sodio anhidro. Para finalizar se realiza la limpieza de la muestra, para lo cual la columna se acondiciona con 8 mL de una mezcla de DCM (diclorometano):hexano (3:1). Se adiciona el extracto obtenido del segundo tubo y los analitos se eluyen con 8 mL de una mezcla de DCM:hexano (3:1). Se realiza un cambio de solvente de DCM a hexano por medio de una corriente suave de nitrógeno a 37°C en un evaporador y la muestra se concentra a 100 µL y se transfiere a un vial para su posterior análisis cromatográfico.

### **Análisis cromatográfico**

El método cromatográfico para las muestras de sedimento y tejido, se lleva a cabo de acuerdo a lo reportado por Trejo-Acevedo et al. (2009). Una vez realizada la extracción correspondiente, 1µL del extracto es inyectado en un cromatógrafo de gases (HP 6890) acoplado a un espectrofotómetro 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 que se utiliza es: 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 es 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 para sedimento y de 0.3 µg/L en tejido.

### **Referencias**

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.



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.



### ANEXO 3

#### Características generales de las especies colectadas

	<i>Ariopsis felis</i> (Bagre)	Clase: Actinopterygii Orden: Siluriformes Familia: Ariidae Género: <i>Ariopsis</i> Especie: <i>felis</i>
	Talla máxima	30 cm
	Ambiente	Demersal
	Importancia	Altamente comercial
	Biología	Especie marina que penetra en aguas salobres y ríos, tolera amplios rangos de salinidad y temperaturas de 30°- 35° C. Detritívoro: se alimenta generalmente de detritus y materia orgánica.
Fuentes:	García y Alcocer 1989; Avise et al., 1987.	

	<i>Centropomus parallelus</i> (Chucumite)	Clase: Actinopterygii Orden: Perciformes Familia: Centropomidae Género: <i>Centropomus</i> Especie: <i>parallelus</i>
	Talla máxima	37 cm
	Ambiente	Demersal
	Importancia	Pesquera comercial y deportiva
	Biología	Habita aguas costeras, estuarios y lagunas, penetrando hasta agua dulce, prefiere aguas poco salobres. Se encuentra fondos suaves poco profundos. Carnívoro: se alimenta principalmente de crustáceos bentónicos, peces y moluscos.
Fuente:	Rivas, 1986; INP, 2006.	





*Eugerres axillaris*  
(Mojarra rayada)

Clase: Actinopterygii  
Orden: Perciformes  
Familia: Gerreidae  
Género: *Eugerres*  
Especie: *axillaris*

Talla máxima	19 cm
Ambiente	Demersal
Importancia	Pesca subsistencia
Biología	Habita aguas costeras y lagunas, prefiere las partes bajas arenosas. Omnívoro: se alimenta de pequeños invertebrados bentónicos, algas y de pequeños peces.
Fuente:	Deckert y Greenfield, 1987.




*Mugil cephalus*  
(Lisa)

Clase: Actinopterygii  
Orden: Perciformes  
Familia: Mugilidae  
Género: *Mugil*  
Especie: *cephalus*

Talla máxima	30 - 40 cm
Ambiente	Bentopelágico, rango de profundidad 0-120 m.
Importancia	Pesquera comercial y deportiva
Biología	Especie costera que entra a menudo en estuarios y ríos. Tolera grandes variaciones de salinidad, desde aguas hipersalinas hasta aguas dulces. Se encuentra en fondos con arena o fango. La reproducción se realiza en el invierno. Detritívoro: se alimenta principalmente de detritus y ocasionalmente de organismos bentónicos.
Fuente:	INP, 2006



	<i>Oreochromis</i> sp (Tilapia)	Clase: Actinopterygios Orden: Perciformes Familia: Cichlidae Género: <i>Oreochromis</i>
	Talla máxima	45 cm
	Ambiente	Bentopelágico, rango de profundidad: - 5 m.
	Importancia	Altamente comercial
	Biología	Especie tolerante a bajas temperaturas y amplio rango de salinidad. Se desarrolla en temperaturas de 8° a 30° C. Se reproducen en aguas dulces y salobres. Omnívoro: se alimenta generalmente de fitoplancton y zooplancton, los organismos juveniles ocasionalmente se alimentan de copépodos y cladóceros.
	Fuente:	Zurres y Lin, 1992.

## REFERENCIAS

Deckert, G. D. y D. W. Greenfield. 1987. A review of the western Atlantic species of the genera *Diapterus* and *Eugerres* (Pisces: Gerreidae). *Copeia* 1987(1):182-194.

García M. F. y A. M. Uribe. 1989. Análisis cromosómico del bagre marino *Arius felis* (Ariidae: Siluriformes) de la región de la Laguna de Términos, Camp. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. 16(1).

INP. 2006. Sustentabilidad y pesca responsable en México, evaluación y manejo. Instituto Nacional de Pesca (INSP) y Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. 544 p.

Rivas L.R. 1986. Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia* 3:579-611.



## ANEXO 4

### Metodología para evaluar biomarcadores de efecto genotóxico en peces

#### ENSAYO COMETA

El método se basa en la observación de células individuales (linfocitos y eritrocitos) con la finalidad de evaluar la fragmentación y migración del ADN, ocasionado por el rompimiento del material genético debido a la exposición a contaminantes genotóxicos. Básicamente, el método consiste en: 1) obtener las células, 2) fijarlas con agarosa en un portaobjetos, 3) someterlas a una solución de lisis con la finalidad de romper la membrana celular, 4) desenrollar el ADN en una solución amortiguadora, 5) realizar una electroforesis, y 6) determinación de daño al material genético.

#### MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO

##### **Equipo**

- Estufa.
- Baño.
- Cámara de electroforesis.
- Fuente de poder.
- Refrigerador.
- Microscopio equipado con luz fluorescente y software "COMET".
- Potenciómetro.
- Cuarto frío.
- Lámpara de luz amarilla.
- Agitador.
- Bascula.
- Microondas.
- Vortex.
- Cronometro.
- Placa con agitador
- Campana de extracción.

- Papel filtro Watman.
- Papel aluminio.
- Papel adsorbente.
- Tijeras.
- Gasa.
- Pipetas Pasteur.
- Chupones.
- Frascos para baño.
- Vacutainer.
- Guantes.
- Botes para depositar puntas.
- Lápiz del No 2 y sharpening.
- Masking Tape.
- Moscas
- Porta-laminillas
- Parafilm
- Pinzas
- Cubrebocas

##### **Materiales**

- Pipetas serológicas.
- Micropipetas.
- Vasos de precipitado.
- Probetas
- Portaobjetos esmerilados.
- Cubreobjetos.
- Tubos cónicos.
- Puntas para micropipetas.
- Tubos eppendorf
- Coplin.
- Charolas
- 

##### **Reactivos**

- Hidróxido de sodio perlas (NaOH)
- Dimethylsulfoxide (DMSO)
- EDTA
- Alcohol anhidro
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Agua desionizada
- Bromuro de etidio
- Cloruro de Sodio
- Tritón X-100
- Trisma Base
- Agarosa de bajo punto de fusión (LMPA)
- Agarosa regular (NMA)



## PREPARACIÓN DE REACTIVOS

### Preparación de agarosa regular al 1%

Se pesa un 0.25g de agarosa y se disuelve en 25 ml de agua desionizada. Para ayudar a disolverse se utiliza microondas a una temperatura de 30°C por 10 o 7 segundos y se agita; de esta manera se procede de forma repetitiva hasta que se disuelva completamente. La agarosa se vierte en un frasco y se coloca en un baño que deberá tener una temperatura de 50°C.

Para preparar la agarosa al 0.6% se pesan 0.075g de agarosa y se disuelven en 12.5ml de agua desionizada.

El rango debe de ser de 0.6-1%.

### *Precauciones y recomendaciones*

- La agarosa **no debe hervir**, si esto sucede, se prepara de nuevo.
- Se debe de cuidar que la agarosa **este bien disuelta** y que no haya residuos en suspensión por lo que deberá tener una tonalidad completamente transparente. Si esto no sucede se deberá preparar de nuevo
- Si baja la temperatura y la agarosa se **solidifica** se debe de preparar de nuevo.
- De preferencia la agarosa **no debe almacenarse** para usarse en otros ensayos posteriores.



### Preparación de la solución de lisis

Se pesa: 146.1 g de NaCl (2.5M), 1.2 g de Trisma base (10mM), 8 g de NaOH (0.2M) y 37.2 g de EDTA (100mM) para disolverse en 890 mL de agua desionizada. En una placa se coloca un vaso de precipitado de 1L y se agrega agua desionizada cuidando no utilizar todo el volumen. Los reactivos se agregan en el siguiente orden: 1) NaCl, 2) Trisma base y 3) de forma alternada el NaOH y el EDTA. Cuando los reactivos están disueltos, se mide el pH, el cual deberá tener un valor de 10. Con una pipeta Pasteur se deberá de agregar gota a gota una solución de hidróxido de sodio (NaOH) para elevar los valores de pH; en el caso que los valores de excedan el valor de 10, se deberá de agregar ácido clorhídrico (HCl) para ajustar los valores de pH. Se le agregan 100 ml de DMSO (10%) y 10 ml de Tritón 100 X (1%). La solución se afora en un matraz de 1L y se filtra posteriormente con papel Watman para su almacenaje en un frasco ámbar debidamente etiquetado. La solución deberá de almacenarse en el cuarto frío a 4C por lo menos durante 1 hr para antes de ser utilizada.

### Precauciones y recomendaciones

- Es importante **aplicar de forma alternada** el NaOH y el EDTA, así como el uso de mosca para facilitar disolverse.
- La solución deberá de **permanecer fría** para su utilización.

### Preparación de la solución para electroforesis

Se pesa 200g de hidróxido de sodio (NaOH, 10N) para disolverse en 500 ml de agua desionizada. La solución se deberá de preparar en una campana de extracción y con la ayuda de un baño. Las perlas de hidróxido de sodio (NaOH) se deberán de agregar de forma paulatina en un vaso de precipitado con agua desionizada hasta disolverse. La solución puede prepararse con la ayuda de una placa con agitador. La solución se afora en un matraz de 500 ml y se filtra posteriormente con papel watman para su almacenaje



en un frasco ámbar debidamente etiquetado. La solución deberá de almacenarse en el cuarto frío.

Posteriormente se pesa 3.72g de EDTA (200mM) para disolverse en 50 ml de agua desionizada. Se deberán de agregar de forma paulatina el EDTA en un vaso de precipitado con agua desionizada hasta disolverse. La solución puede prepararse con la ayuda de una placa con agitador. Cuando el reactivo este disuelto, se mide el pH, el cual deberá tener un valor de 10. Con una pipeta Pasteur se deberá de agregar gota a gota una solución de hidróxido de sodio (NaOH) para elevar los valores de pH. En el caso que los valores excedan el valor de 10, se deberá de aplicar ácido clorhídrico (HCl) para ajustar los valores de pH. La solución se afora en un matraz de 50ml y se filtra posteriormente con papel Watman para su almacenaje en un frasco ámbar debidamente etiquetado. La solución deberá de almacenarse en el cuarto frío y protegerse de la luz.

Finalmente la **solución amortiguadora para electroforesis** se prepara con: 48 ml de hidróxido de sodio (NaOH, 10N), 8 ml de EDTA (200mM) y 1544 de agua desionizada. Posterior a la mezcla, se mide el pH, el cual deberá tener un valor de 13 o mayor. Con una pipeta Pasteur se deberá de agregar gota a gota una solución de hidróxido de sodio (NaOH) para elevar los valores de pH. En el caso que los valores de excedan el valor de 10, se deberá de aplicar ácido clorhídrico (HCl) para ajustar los valores de pH. La solución se afora en un vaso de precipitado de 2000 ml y se filtra posteriormente con papel Watman para su almacenaje en un frasco ámbar debidamente etiquetado. La solución deberá de almacenarse en el cuarto frío.

#### *Precauciones y recomendaciones*

- La solución deberá de **permanecer fría** para su utilización.
- Se puede utilizar las soluciones de hidróxido de sodio (NaOH, 10N) y de EDTA (200mM) para preparar posteriores soluciones de electroforesis



### Preparación de la Trisma

Se pesa 12.12g de Trisma base (0.4M) para disolverse en 250 ml de agua desionizada. El Trisma se deberá de agregar de forma paulatina en un vaso de precipitado con agua desionizada hasta disolverse. Posterior a la mezcla, se mide el pH, el cual deberá tener un valor de 7.5, de lo contrario se procederá al ajuste de este. La solución puede prepararse con la ayuda de una placa con agitador. La solución se afora en un matraz de 250 ml y se filtra posteriormente con papel Watman para su almacenaje en un frasco ámbar debidamente etiquetado. La solución deberá de almacenarse en el cuarto frío.

### *Precauciones y recomendaciones*

- La solución deberá de **permanecer fría** para su utilización.

### Preparación de solución de lisis en el coplin

En el coplin se agrega 50 ml de la solución de lisis previamente preparada. La solución vierte al coplin con una probeta. El coplin deberá de almacenarse en el cuarto frío por lo menos una hora antes de su uso.

### *Precauciones y recomendaciones*

- Las laminillas deberán de permanecer **por lo menos una hora** en el coplin antes de pasar a la electroforesis.
- El tiempo de duración de las laminillas en el coplin no debe de exceder 2 semanas de almacenaje.



### Preparación de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%

Se pesa un 0.125g de agarosa y se disuelve en 25 ml de agua desionizada. Para ayudar a disolverse se utiliza microondas a una temperatura de 30°C por 10 o 7 segundos y se agita; de esta manera se procede de forma repetitiva hasta que se disuelva completamente. La agarosa se vierte en un frasco y se coloca en un baño que deberá tener una temperatura de 37°C.

Para preparar la agarosa al 0.6% se pesan 0.075g de agarosa y se disuelven en 12.5ml de agua desionizada.

### *Precauciones y recomendaciones*

- La agarosa **no debe hervir**, si esto sucede, se prepara de nuevo.
- Se debe de cuidar que la agarosa **este bien disuelta** y que no haya residuos en suspensión por lo que deberá tener una tonalidad completamente transparente. Si esto no sucede se deberá preparar de nuevo
- Si baja la temperatura y la agarosa se **solidifica** se debe de preparar de nuevo.
- De preferencia la agarosa **no debe almacenarse** para usarse en otros ensayos posteriores.

## **PREPARACIÓN DE CAMAS**

Se colocan las laminillas a utilizar con el esmerilado hacia arriba en un vaso de precipitado con alcohol anhidro, se tapan con parafilm y se dejan por un tiempo de 15 minutos. Mientras el tiempo transcurre se cortan trozos de gasa en forma de cuadros. Se preparan con aluminio las charolas donde se colocaran las laminillas. Las laminillas se





toman con una pinza por el lado esmerilado y se limpian con la gasa. Posteriormente se colocan en la charola y se rotulan por la parte esmerilada.

A la laminilla se le colocan **150 µl** de agarosa regular. La agarosa se distribuye con la ayuda de la punta del dedo por toda la laminilla. Las laminillas con la cama de agarosa se colocan en las charolas y se secan en el horno una temperatura de 65-70°C. Una vez que estén bien secas y frías las laminillas pueden ser almacenadas en cajas porta-laminillas.

#### *Precauciones y recomendaciones*

- Se deberá de **utilizar guantes** en este procedimiento.
- Se deberá de tener las **manos limpias** para la distribución de la agarosa en la laminilla.
- Se deberá de tener cuidado de **no pasar muchas veces el dedo** en la laminilla, lo que podría causar una cama irregular.
- Las laminillas se deben de **utilizar antes de 2 semanas**, de lo contrario se desechan.

## **PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ENSAYO**

Se obtiene la sangre del individuo en un vacutainer y se coloca en un agitador. Se colocan los tubos eppendorf debidamente etiquetados en placas de únicel.

Se toman **5 µl** de sangre con la micropipeta y se colocan en el fondo del tubo eppendorf correspondiente, después se colocan **240 µl** de agarosa de bajo punto de fusión y se homogeniza con el vortex, de esta mezcla se toman **15 µl** y se mezclan en un tubo eppendorf nuevo con **225 µl** de agarosa de bajo punto de fusión. Finalmente de esta última mezcla, se toman **75 µl** y se colocan sobre la cama en la laminilla correspondiente, enseguida se coloca un cubreobjetos.



Las laminillas se colocan en la charola para llevarse a refrigeración por 5 minutos. Transcurrido el tiempo se retira de forma delicada el cubreobjetos de la laminilla y se le agrega **75 µl** u **80 µl** de agarosa de bajo punto de fusión. Se coloca un nuevo cubreobjetos y se pone en la charola para llevarse a refrigeración por 5 minutos.

Transcurrido el tiempo, se retira de forma cuidadosa el cubreobjetos y se desecha. Las laminillas se colocan en pares en el coplin con la solución de lisis.

### *Precauciones y recomendaciones*

- La sangre tiene una **viabilidad para su uso en el ensayo de 3 horas** aproximadamente.
- Se deberá de tener cuidado al colocar mezcla de sangre con agarosa en la laminilla para **no formar burbujas**.
- Se deberá de tener cuidado al colocar mezcla de **no tocar la cama de agarosa** en la laminilla con la punta de la pipeta.
- Se deberá de tener cuidado de **colocar espalda con espalda** las laminillas para evitar el daño de las muestras.
- Las laminillas deberán de tener **por lo menos una hora en la solución de lisis** en el coplin antes de realizar la electroforesis.
- Las laminillas se deben de sacar del coplin **antes de 2 semanas**, de lo contrario se pierde la muestra.

## **ELECTROFORESIS**

En el cuarto frío, se coloca la cámara de electroforesis, asegurándose de que esté centrada por la burbuja indicadora, de lo contrario se ajusta de las patas hasta la posición adecuada. Después, la cámara se conecta a la fuente de poder de acuerdo con el color y



la polaridad de los cables (rojo-positivo, negro-negativo). El trabajo hasta este momento se realiza en completa oscuridad y sólo con ayuda de la lámpara de luz amarilla, con la finalidad de no dañar el DNA con la luz.

Se coloca la solución de electroforesis en la cámara, hasta la plataforma por ambos lados, sin que la solución se junte. Después se colocan las laminillas en la cámara (se colocan o muestras o repeticiones) con pinzas por la parte esmerilada y asegurándose que este en la dirección correcta. Colocadas las laminillas se vierte la solución de electroforesis hasta cubrir las laminillas, asegurándose que no queden burbujas. Las laminillas se quedan en la solución de electroforesis por **5 minutos**. Mientras transcurre el tiempo se configuran los parámetros de la fuente de poder a **25 V, 300 A y 10 minutos**.

Transcurrido el tiempo de las laminillas, en la solución de electroforesis, se coloca la tapa y se prende la fuente de poder con los parámetros configurados previamente. Se observa unos segundos la formación de espuma y un valor constante de 300 A lo que indica que la electroforesis se está llevando a cabo correctamente. Si el valor de 300 A baja, se deberá de colocar mas solución de electroforesis por un costado de la cámara hasta obtener el valor deseado. Después se coloca la placa metálica que cubre la cámara. Transcurrido el tiempo el Voltaje marca E y se puede apagar la fuente, para quitar la tapa

Las laminillas se sacan con las pinzas y se secan por debajo con papel. Las laminillas se colocan en la charola de lavados y se les pone Trisma (aproximadamente 1 pipeta Pasteur por muestra) y se dejan reposar 5 minutos; transcurrido el tiempo el procedimiento se repite. Después se escurren y se les aplica alcohol anhidro (aproximadamente 1 pipeta Pasteur por muestra) y se dejan reposar 5 minutos; transcurrido el tiempo el procedimiento se repite. Finalmente las laminillas se escurren y son colocadas en un coplin con alcohol anhidro por otros 5 minuto, terminado el tiempo se sacan y se limpian por debajo con papel, al secarse se guardan en una caja porta-laminillas.



### *Precauciones y recomendaciones*

- Se debe de asegurar de **enjuagar las pinzas** antes de tomar otra laminilla.
- Se debe de asegurar colocar por la parte posterior la laminilla, de lo contrario se perderá la muestra.
- Se deberá de tener cuidado de **colocar espalda con espalda** las laminillas para evitar el daño de las muestras.
- Se debe de asegurar la **dirección correcta** para la realización de la electroforesis.

### **LECTURA Y ANÁLISIS DE DATOS**

Se enciende el regulador, el CPU, el monitor, la lámpara de mercurio y el microscopio. Se ajusta y se centra el microscopio. Finalizando la calibración se abre el programa Komet v4.0. Posteriormente se toma una laminilla y se le coloca 25µl de bromuro de etidio (0.05mM) y un cubreobjetos. Se enfoca con el objetivo de 20X hasta ver de forma adecuada el campo. Después se procede a la lectura con la técnica circular o en zig-zag. En el software Komet v4.0 se pulsa “experiment” y se le asignan 2 ID (Muestras), después se pulsa “Live”. El programa contabiliza 100 células (50 muestra y 50 duplicado).