



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



"La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra"

Evaluación de la contaminación del Río Atoyac en los municipios de San Martín Texmelucany Tepetitla de Lardizábal.

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

ANDRÉS ESTRADA RIVERA

Directora de tesis:
DC Anabella Handal Silva



Octubre 2022



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



"La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra"

Evaluación de la contaminación del Río Atoyac en los municipios de San Martín Texmelucany Tepetitla de Lardizábal.

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

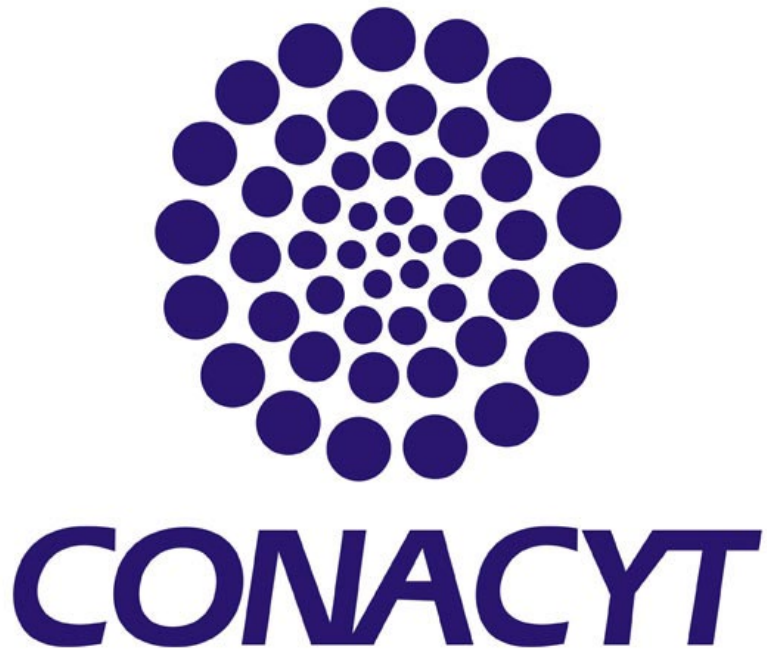
Presenta

ANDRÉS ESTRADA RIVERA

Comité Tutoral:

Directora	DC Anabella Handal Silva
Co-Director	DC Alfonso Díaz Fonseca
Tutora	DC Edith Chávez Bravo
Integrante Comité Tutoral	DC Wendy Argelia García Suastegui
Integrante Comité Tutoral	DC Rosalía del Carmen Castelán Vega
Integrante Comité Tutoral	DC María Teresa Zayas Pérez
Integrante Comité Tutoral	DC Samuel Treviño Mora

Octubre 2022



Este trabajo fue realizado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a Andrés Estrada Rivera (xxxxx

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema.	2
1.2. Justificación.	3
1.3. Preguntas de investigación.	4
1.3.1. Pregunta general	4
1.3.2. Preguntas particulares	4
1.4. Objetivos.	4
1.4.1. Objetivo General	4
1.4.2 Objetivos Particulares	4
1.5. Hipótesis.	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.	5
2.1 Contaminación ambiental.....	5
2.2. Contaminación del agua	6
2.3. Contaminación de ríos.	6
2.3.1. Contaminación de los ríos en México.	7
2.4. Toxicología.....	14
2.5. Citotoxicidad	15
2.5.1. Ciclo celular	16
2.6. Aparato branquial.....	20
2.6.1. Estructura y función de la branquia	20
2.7. Estructura y función del hígado.....	21
2.8. Efecto tóxico sobre los sistemas vegetales.	22
2.9. Sistema radicular	23
2.9.1. La raíz como sistema de ensayo	25
2.10. Estrés oxidativo/nitrosativo	25
2.10.1. Radicales libres	26
2.11. Biomarcadores	27
2.11.1. Biomarcadores de estrés oxidativo/nitrosativo	28
2.11.1.2. Mecanismos enzimáticos y no enzimáticos antioxidantes	30
2.12. Matalotioneína (MT) como biomarcador	31
CAPÍTULO III. METODOLOGIA.....	32

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	33
3.2. Descripción de la zona de estudio	34
3.2.1. Descripción del medio físico de la zona de estudio.	34
3.2.2. Relieve.	35
3.2.3. Características biofísicas	35
3.2.4. Características sociales	36
3.2.5. Actividad económica	36
3.3. Distribución industrial.....	38
3.3.1. Determinación de densidad industrial (DI) y poblacional (DP).	38
3.4. Selección de sitios de muestreo y toma de muestras.....	39
3.5. Análisis de parámetros.....	40
3.5.1 Determinación de propiedades fisicoquímicas in situ.	40
3.5.2. Determinación de propiedades fisicoquímicas en laboratorio.	41
3.6. Acondicionamiento de biomodelos: <i>Danio rerio</i> y <i>Allium cepa</i>	42
3.6.1. Pez cebra (<i>Danio rerio</i>) en condiciones de adaptación.	42
3.6.2. Bioensayos de toxicidad en pez cebra	42
3.6.3. Obtención de muestras.	43
3.6.4 Determinaciones bioquímicas	43
3.6.5. Métodos y fundamentos	43
3.7. Bioensayos de toxicidad en cebolla.....	44
3.8. Análisis estadístico.....	46
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....	47
4.1. Distribución espacial de la industria.....	47
4.2. Clasificación de la industria en zona de estudio	48
4.3. Densidad industrial y poblacional.....	50
4.4. Caracterización fisicoquímica del agua en las zonas de estudio.....	51
4.5. Metales pesados y arsénico en el agua de las zonas de estudio.....	52
4.6. Compuestos orgánicos volátiles (COV's).....	54
4.7. Evaluación de metalotioneínas en branquias e hígado.	56
4.8. Evaluación de malondialdehído en branquias e hígado de pez cebra.....	57
4.9. Evaluación de óxido nítrico en branquias e hígado de pez cebra.....	58

4.11. Índices mitóticos y de fases	60
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....	63
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.....	73
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS.....	74
ANEXOS.....	93

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios de selección zonas de estudio -----	40
Tabla 2. Actividades manufactureras y de la construcción en zonas de estudio -----	49
Tabla 3. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos del agua -----	52
Tabla 4. Concentración de Metales Pesados y arsénico en las zonas de estudio. -----	53
Tabla 5. Compuestos orgánicos volátiles en las tres zonas de estudio. -----	55
Tabla 6. Promedio del número de raíces y su longitud de <i>A. cepa</i> -----	59
Tabla 7. Promedio del Índice Mitótico (IM), índice Interfásico (II) e índice de fases -----	60

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación geográfica de la subcuenca del Alto Atoyac.	13
Figura 2. Los agentes contaminantes modifican el ciclo celular.	16
Figura 3. Sistema respiratorio en peces y estructura branquial.	20
Figura 4. Vista microscópica de branquia.	21
Figura 5. Ubicación del hígado en peces.	21
Figura 6. Estructura microscópica del hígado.	22
Figura 7. Efecto de agentes contaminantes en el sistema radicular	23
Figura 8. Partes de la raíz.	25
Figura 9. Radicales libres y el estrés oxidativo.	26
Figura 10. Representación esquemática de la peroxidación lipídica.	29
Figura 11. Catalización del óxido nítrico por la enzima NOS.	31
Figura 12. Diagrama de trabajo de la tesis de investigación	34
Figura 13. Mapa de las zonas de estudio en el Río Atoyac.	38
Figura 14. Toma de muestras de agua en las zonas de estudio.....	41
Figura 15. Bioensayo crónico utilizando el biomodelo <i>Danio rerio</i>	42
Figura 16. Disección y macerización de órganos	43
Figura 17. Diagrama de <i>Allium cepa</i> test	45
Figura 18. Fases del ciclo celular en meristemas de <i>Allium cepa</i>	45
Figura 19. Vista panorámica de la distribución industrial	47
Figura 20. Giros industriales	50
Figura 21. Densidad urbana	51
Figura 22. Porcentaje de las concentraciones de arsénico y MP	54
Figura 23. Porcentaje de las concentraciones de COV's.....	56
Figura 24. Concentración de metalotioneínas en branquia e hígado	57
Figura 25. Concentración de malondialdehído en branquia e hígado	58
Figura 26. Concentración de nitrito en branquia e hígado	58
Figura 27. Promedio del número y longitud de raíces de <i>A. cepa</i>	60
Figura 28. Índice mitótico e índice interfásico en <i>A. cepa</i>	61
Figura 29. Índices de fases mitóticas en <i>A. cepa</i>	61

Índice de abreviaturas

Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
Ce	Conductividad eléctrica
COV's	Compuestos orgánicos volátiles
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DBO ₅	Demanda bioquímica de oxígeno
DENUE	Directorio nacional de Unidades Económicas
DI	Densidad industrial
DQO	Demanda química de oxígeno
EN	Estrés nitrosativo
EO	Estrés oxidativo
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
HCl	Ácido clorhídrico
Hg	mercurio
IA	Índice anáfasico
ICA	Índice de calidad del agua
II	Índice interfásico
IMe	Índice metafásico
IM	Índice mitótico
IP	Índice profásico
IT	Índice telofásico
LMP	Límite máximo permitido
RL	Radical libre
MDA	Malondialdehído
Ni	Níquel
NO ²⁻	Óxido nítrico
NOM	Normas Oficiales Mexicanas
NMX	Norma Mexicana
OD	Oxígeno disuelto
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	Plomo
PI	Índice de contaminación integrado
PTAR	Planta tratadora de aguas residuales
TUB	Turbidez
Z1	Zona de estudio 1
Z2	Zona de estudio 2
Z3	Zona de estudio 3
Zn	Zinc

A Dios

Porque creo en Dios gracias a la ciencia y no a pesar de la ciencia le doy gracias por darme salud y los dones necesarios para desarrollar y culminar esta humilde obra que espero aporte conocimiento y conciencia a todo aquel que la lea. Gracias Señor.

A mis padres (Q.E.P.D.)

Por darme la vida, educarme con buenos ejemplos y darme su apoyo espiritual y material para lograr mis objetivos académicos y personales.

A mis directores de tesis

Le agradezco muy profundamente a la Doctora Anabella Handal Silva y al Doctor Alfonso Días Fonseca por su dedicación y paciencia, sin sus palabras y correcciones precisas no hubiese podido lograr llegar a esta instancia tan anhelada. Gracias por su guía y todos sus consejos, los llevaré grabados por siempre en la memoria en mi futuro profesional.

A los integrantes de mi comisión revisora:

D.C. Samuel Treviño Mora, D.C. Edith Chávez Bravo, D.C. Wendy García Suastegui, D.C. Rosalía del Carmen Castelán Vega, D.C. María Teresa Zayas Pérez.

A todos mis docentes

Son muchos los docentes que han sido parte de mi camino universitario, y a todos ellos les quiero agradecer por transmitirme los conocimientos necesarios para hoy poder estar aquí.

Gracias a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Las oportunidades que me ha brindado son incomparables, agradezco mucho a la universidad en general. Después de años de esfuerzo, sacrificios, dedicación y alegrías. Llegó el día en que tendré que mirar hacia atrás para ver el camino recorrido por tus pasillos y aulas. Y me detendré a agradecerte por siempre a ti mi alma mater.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La Organización de las Naciones Unidas define la contaminación ambiental de la siguiente manera: *La contaminación ambiental consiste en introducir elementos físicos, químicos o biológicos en el medio ambiente natural ya sea suelo, aire o agua, provocando que los medios naturales sean inseguros y no aptos para su uso como materia prima y medio de subsistencia* (ONU, 2019). Hoy en día la contaminación es una de las preocupaciones más grandes que enfrenta el ser humano, ya que pone en peligro la salud y el bienestar del ser humano y otros organismos (Domínguez, 2015). De acuerdo con datos de la ONU (2019), las principales causas que han comprometido la calidad ambiental del planeta han sido el crecimiento poblacional, el desarrollo económico y la globalización las cuales generan grandes cantidades de contaminantes. Los efectos de la contaminación al planeta son el cambio climático, pérdida de ecosistemas, de biodiversidad, alteración de los ciclos biogeoquímicos, acidificación de océanos y la pérdida de la capa de ozono (IPCC, 2014).

De acuerdo con un estudio realizado por expertos del Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente, si no se aplican normas de protección ambiental a corto y largo plazo a mediados del siglo XXI se producirán millones de muertes prematuras en el mundo a causa de los factores contaminantes (ONU, 2019). De acuerdo con el último informe de la OMS en el 2021 los países que más contribuyen a la contaminación del ambiente son China, Estados Unidos, India, y Alemania los cuales abonan enormes cantidades de desechos que afectan directamente al ambiente y a la salud humana. Desafortunadamente a nivel global existe poca conciencia y compromiso de líderes políticos y económicos quienes se aferran a un paradigma obsoleto de producción y desarrollo (ONU, 2019; OMS, 2015).

México no está exento de esta situación ya que ha seguido el mismo modelo de desarrollo que la mayoría de los países industrializados, a partir de la segunda mitad del siglo XX y hasta hoy, el Estado Mexicano se ha enfocado principalmente en el crecimiento económico y la industrialización favorecieron el incremento poblacional, la creación de grandes núcleos urbanos y el desarrollo de la infraestructura de telecomunicaciones. (SEMARNAT, 2015). A causa de este modelo económico las emisiones contaminantes atmosféricas aumentan en promedio 40.5 millones de toneladas al año de acuerdo con Inventario Nacional de Emisiones (Rodríguez, 2021), el 73 % de los cuerpos de agua del país se encuentran contaminados debido a que el 80 % de las descargas de centros urbanos y el 85 % de descargas industriales se vierten sin tratamientos de purificación, y en México se generan aproximadamente 42 millones de toneladas al año de residuos sólidos colocándolo como el primer lugar en Latinoamérica (ANIPAC, 2020).

Ante este panorama toma relevancia la evaluación del impacto de los contaminantes en el medio ambiente como una herramienta que ayude a identificar e interpretar los efectos negativos tanto en los factores abióticos como bióticos de los ecosistemas y así prevenir, mitigar e incluso restaurar los daños al ambiente a través de una política ambiental que en base a las evidencias regule obras y actividades antropogénicas a fin de reducir sus efectos negativos en el ambiente (Riojas et al., 2013; SEMARNAT, 2022).

1.1. Planteamiento del problema.

En la década de los 80's inicia en México la introducción del neoliberalismo, política que influyó en el desarrollo económico del país. Esta estrategia provocó un acelerado crecimiento y propagación de los procesos de urbanización e industrialización (Navarro, 2017), ejemplo de ello fue lo ocurrido en los municipios de San Martín Texmelucan y Tepetitla de Lardizábal. Por un lado, ambos municipios presentaron un incremento acelerado de crecimiento demográfico acompañado del desarrollo de industrias manufactureras como: la textil, metalúrgica, papelera, química, petroquímica y alimenticia y por otro lado este desarrollo, mal planificado, impacto en el deterioro de la calidad del agua del Río Atoyac.

Es importante mencionar que este río forma la cuenca Alta del Balsas que cubre un área de 50,408.7 km² y comprende los estados de Tlaxcala, Puebla, Morelos, Oaxaca y Guerrero. Por consiguiente, la cuenca del Alto Balsas constituye la mayor influencia natural en la economía ecológica y sus descargas determinan la naturaleza de sus procesos sedimentarios que se inician en San Martín Texmelucan y Tepetitla de Lardizábal. Resultado de lo anterior, es en estos municipios, donde se inició la generación de grandes volúmenes de agua residual tanto de origen urbano como industrial, aunado a esta situación se presenta el hecho que estas aguas no son tratadas adecuadamente antes de ser vertidos al río (Sandoval *et al.*, 2009; Bravo *et al.*, 2015; Castro, 2017).

Investigaciones previas han demostrado que el agua del río contiene elevadas concentraciones de mercurio, níquel, plomo, cianuro, arsénico, cobre, cromo, cadmio, zinc, tolueno, cloroformo, cloruro de vinilo, fenoles, compuestos de benceno, xilenos, nitritos y nitratos, entre otros (CONAGUA, 2008; Castro *et al.*, 2019; La Jornada, 2020). De igual manera se ha demostrado que esta contaminación antropogénica se encuentra asociada a la actividad industrial en la zona, la cual se incrementa con el tiempo (Soto, 2019; Estrada *et al.*, 2022). Por ello existe una preocupación creciente por conocer el efecto de estas sustancias químicas en los organismos. Varios investigadores, al respecto han detectado graves enfermedades causadas por los contaminantes vertidos al río, así como, daño al ecosistema y la biodiversidad por las industrias asentadas en la región desde hace más de 30 años (Montero *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2018; Sandoval *et al.*, 2009).

Por consiguiente, es importante evaluar el origen de las actividades antropogénicas que han generado la gran cantidad y variedad de contaminantes existentes en la zona, sus concentraciones y su persistencia, así como, los efectos adversos que estos provocan sobre los organismos, para determinar la relación causa-efecto ante la presencia de agentes químicos y sus efectos biológicos. Estos ensayos ecotoxicológicos utilizan distintas especies de organismos que presentan un amplio rango de sensibilidades a una extensa diversidad de contaminantes ambientales. En la actualidad, estas pruebas están ausentes en todas las normas oficiales mexicanas. Teniendo en cuenta los criterios anteriores, se plantea como objetivo en el presente proyecto de investigación evaluar el efecto contaminante del agua del río Atoyac en el sistema antioxidante y celular en los biomodelos

Danio rerio y *Allium cepa*. A la fecha no existen investigaciones similares en la zona de estudio, que permitan contrastar los resultados que arroja la presente investigación.

1.2. Justificación.

La contaminación en el río Atoyac en los municipios de San Martín Texmelucan y Tepetitla de Lardizábal se debe a la descontrolada eliminación de desechos industriales y urbanos que ha resultado en la deposición de una gran variedad y cantidad de compuestos químicos tóxicos que constituyen un problema ambiental importante sin resolver aún por las autoridades y población de ambos municipios. Tal situación ha producido un desequilibrio en los ecosistemas y amenaza la estabilidad y calidad de vida de sus habitantes. Si bien ya existen trabajos previos que han evaluado la condición de la degradación del agua en la zona del Alto Atoyac la mayoría se enfocan en determinar la calidad fisicoquímica y microbiológica del agua.

Con esta investigación se pretende dar a conocer el origen de la contaminación antropogénica en el área de estudio, determinar y cuantificar, en las tres zonas de estudio: metales pesados, compuestos orgánicos volátiles y parámetros fisicoquímicos, realizar estudios de ecotoxicología en organismos altamente sensibles como son: *Danio rerio* y *Allium cepa* con el objetivo de evaluar los efectos de las sustancias químicas tóxicas en el agua del río Atoyac, en las tres zonas de estudio, y analizar su efecto en los organismos biológicos a nivel bioquímico, celular y molecular.

Este tipo de estudios son limitados en la zona de estudio. Se estima que los resultados podrían ser un referente del riesgo al que potencialmente se encuentran expuestas los organismos acuáticos y los seres humanos. Estos resultados podrían informar y concientizar a la sociedad, los industriales y las autoridades y a su vez, servir como herramienta en la toma de decisiones en los posibles procesos de gestión ambiental en la cuenca del río Atoyac y así proteger este valioso recurso.

1.3. Preguntas de investigación.

1.3.1. Pregunta general

¿Qué efectos tendrá el agua contaminada del río Atoyac en el sistema antioxidante y ciclo celular en los sistemas biológicos *Danio rerio* y *Allium cepa*, respectivamente?

1.3.2. Preguntas particulares

1. ¿Cuáles son las principales fuentes y agentes contaminantes del río Atoyac en la zona de San Martín Texmelucan y Tepetitla de Lardizábal?
2. ¿Qué efectos bioquímicos y fisiológicos tiene el agua contaminada del río Atoyac en la zona de estudio, en *Danio rerio*?
3. ¿Cuáles son los efectos citotóxicos en las zonas de estudio del Río Atoyac en *Allium cepa*?

1.4. Objetivos.

1.4.1. Objetivo General.

Evaluar el efecto contaminante del agua del río Atoyac en el sistema antioxidante y celular en los biomodelos *Danio rerio* y *Allium cepa*.

1.4.2 Objetivos Particulares.

1. Identificar las actividades antropogénicas en San Martín Texmelucan y Tepetitla de Lardizábal.
2. Caracterizar la calidad fisicoquímica, la concentración de metales pesados y compuestos orgánicos volátiles en el agua del Río Atoyac en las zonas de estudio.
3. Evaluar el daño que induce el agua contaminada del Atoyac en el sistema antioxidante de *Danio rerio*.
4. Evaluar el efecto citotóxico que produce el agua contaminada del Río Atoyac en *Allium cepa*.
5. Analizar la problemática ambiental de la contaminación del Río Atoyac en San Martín Texmelucan y Tepetitla de Lardizábal.

1.5. Hipótesis.

Resultado de las actividades antropogénicas en San Martín Texmelucan y Tepetitla de Lardizábal, el agua superficial del río Atoyac contiene sustancias químicas tóxicas que son capaces de inducir estrés oxidativo y citotoxicidad en los sistemas biológicos *Danio rerio* y *Allium cepa*.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.

2.1 Contaminación ambiental.

La contaminación ambiental se produce debido a dos factores importantes: el crecimiento de la población humana y el intenso desarrollo industrial necesario para la satisfacción de las necesidades primarias y secundarias de la población. Esto ha provocado la generación de diferentes contaminantes físicos, químicos y biológicos que inducen desequilibrios en el medio ambiente (Centeno, 2004).

Durante miles de años el ser humano coexistió en equilibrio con el ambiente que lo rodeaba porque las actividades económicas de las sociedades estaban limitada a la producción de autoconsumo con un intercambio reducido de la producción agropecuaria, sin embargo, el crecimiento demográfico, el desarrollo industrial y el avance de los procesos tecnológicos a mediados del siglo pasado comenzó un proceso de degradación ambiental a gran escala (Sepúlveda, 1999). El crecimiento poblacional propició la concentración de asentamientos humanos que transformaron el terreno y el uso del suelo dando lugar a las ciudades requieren agua, alimentos y energía para su funcionamiento. Como resultado de la transformación de los recursos naturales, las ciudades generan enormes cantidades de residuos sólidos, líquidos y atmosféricos que dañan a los ecosistemas (SEMARNAT, 2008). Por otra parte, el desarrollo tecnológico ha propiciado aumento en la calidad de vida del ser humano y el aumento en la esperanza de vida. Como consecuencia la población mundial se ha incrementado y por lo tanto también se incrementó el aumento del consumo de materias primas y de energía para satisfacer las necesidades de la población (WWF, 2012).

La rapidez de los avances tecnológicos ha desbalanceado el equilibrio entre los ecosistemas rebasando su capacidad natural de regeneración, agotando los recursos energéticos y de materias primas debido a su utilización intensa e irracional (Surasky & Morosi, 2013). La contaminación ambiental se define como el ingreso al ambiente de agentes contaminantes físicos, químicos y biológicos que inducen un cambio indeseable en las características de los recursos naturales como la pérdida de biodiversidad, la alteración fisicoquímica del agua, el suelo y el aire, así como efectos en la salud de las poblaciones silvestres en los ecosistemas expuestas mezclas de contaminantes tóxicos. (Doménech, 2003; Apaza, 2015).

Entre los principales agentes contaminantes químicos están plaguicidas, metales pesados, compuestos orgánicos e inorgánicos; los contaminantes físicos son formas de energía las cuales se pueden manifestar como ruido, calor, radiaciones ionizantes y no ionizantes, en tanto que los agentes contaminantes biológicos son microorganismos como bacterias, hongos, virus y protozoos que al ingresar a otro sistema biológico inducen un efecto adverso a su salud (Díaz, 2018). También se ha considerado como contaminante biológico a las sustancias o secreciones procedentes de estos microorganismos (Rubio, 2019).

2.2. Contaminación del agua

El agua es uno de los recursos naturales indispensables para la vida y cada vez más se convierte en un bien preciado por la sociedad actual, debido a su progresiva escasez. El agua potable para consumo humano apenas representa el 3 % del agua total en el planeta y se encuentra contenida en los casquetes polares, aguas subterráneas, lagos y ríos. El agua fresca, como la de los ríos, lagos y subterránea es utilizada para todas las actividades del ser humano como agricultura, industria e incluso recreación (De Buen, 2007).

Desafortunadamente, el agua superficial se encuentra expuesta a una gran cantidad de contaminantes vinculados a una gran cantidad y diversidad de actividades antropogénicas como las domésticas, industriales y comerciales (Muoi *et al.*, 2022), que vierten grandes cantidades de aguas residuales (Xu *et al.*, 2022). Por otro lado, las actividades agropecuarias participan en un alto porcentaje en la polución de los cuerpos de agua, se estima que del total nitrógeno vertido en el agua dos terceras partes provienen del sector agropecuario; un tercio son desechos animales y otro tanto corresponde a los escurrimientos de los productos agroquímicos utilizados en los cultivos, lo que significa que las regiones con extensas áreas dedicadas a la agricultura y ganadería tienen un alto riesgo de generar contaminación difusa en los cuerpos de agua (Aguilar & Pérez, 2008).

Además, la generación de desechos sólidos y la erosión del suelo son otros factores que degradan la calidad de los cuerpos de agua (Rahman *et al.*, 2021). La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al agua contaminada como aquella cuya *“composición ha sido modificada de modo que no reúna las condiciones para el uso que se le hubiera destinado en su estado natural”*. Además, esta alteración en las propiedades físicas, químicas y biológicas del agua pueden generar efectos nocivos a la salud y la supervivencia de los seres vivos (Fernández, 2008).

2.3. Contaminación de ríos.

Los ríos cumplen funciones de suma importancia, desalojan el exceso de agua que cae en áreas altas realizando así una función de drenaje conectando las cuencas terrestres con el mar, abastecen de agua a los seres humanos, ayudan a evitar inundaciones, mantienen el flujo de nutrientes y salinidad de estuarios, albergan una alta cantidad de biodiversidad ya que son hábitat para peces, aves y plantas (Morales *et al.*, 2021).

La contaminación de los ríos se considera una de las problemáticas ambientales más antiguas en la historia de la humanidad ya que, hace más de cinco mil años los ríos fueron esenciales para el desarrollo de las primeras civilizaciones humanas (Mesopotamia, Egipto, China, etc.) facilitando el desarrollo de sistemas agrícolas y ganaderos que los abastecía de agua y de peces. Sin embargo, el desarrollo socioeconómico y tecnológico que alcanzaron estas civilizaciones antiguas propició la producción de desechos principalmente orgánicos que eran arrojados a la corriente de los ríos iniciando así el proceso de contaminación de estos recursos hasta el día de hoy (Turri, 1993).

Un río se contamina cuando se altera su estado natural debido a la introducción de sustancias químicas o elementos físicos que afectan su equilibrio. Los contaminantes más comunes vertidos en estos ecosistemas acuáticos incluyen materia orgánica, compuestos orgánicos, metales pesados, fertilizantes y plaguicidas (Izurieta, 2012; Hae *et al.*, 2020) formando mezclas contaminantes complejas con potencial tóxico que impactan en la biodiversidad, el ecosistema y la salud de los habitantes (Maja *et al.*, 2016).

Debido a la contaminación, los ríos sufren una reducción en la calidad de sus servicios ecosistémicos que en algunos casos se pierden de manera irremediablemente como el abastecimiento de agua potable (SEMARNAT, 2020), situación que tiene injerencia directa en el abastecimiento de alimentos y la biodiversidad al no haber un mantenimiento adecuado del hábitat acuático para la supervivencia de peces, insectos, flora acuática, aves y en general biodiversidad de vida silvestre (Encalada, 2017).

Otro efecto negativo se observa en los servicios culturales ya que la degradación de los ríos afecta su valor estético, además que las actividades recreativas y de educación se ven sumamente afectadas (CONABIO, 2022). En resumen, la contaminación de los ríos tiene un enorme costo para el ser humano y los ecosistemas, las ganancias económicas de unos pocos no justifican las graves pérdidas a largo plazo de los servicios ambientales que los cuerpos de agua superficiales como los ríos proporcionan a la humanidad (Encalada 2017).

2.3.1. Contaminación de los ríos en México.

México no es ajeno al fenómeno de la contaminación de los ríos. De acuerdo con datos de CONAGUA (2018) el 70 % de los cuerpos de agua superficial en México están contaminados, y de estos el 31 % se clasifican como extremadamente contaminados (Chávez, 2015).

Los principales factores contaminantes de esta degradación hídrica son el crecimiento urbano, las actividades productivas agrícolas e industriales (Rivera *et al.*, 2007). En México sólo el 32.6 % de las aguas residuales municipales y el 47.5 % de las aguas industriales reciben tratamiento antes de ser vertidos a la red drenaje o a los cuerpos de agua (BID, 2013) y de éstas un porcentaje muy bajo cumple con los parámetros establecidos por las normas oficiales mexicanas en materia de calidad de descargas (Consejo consultivo del agua, 2018). Adicionalmente a esto las políticas públicas en el país anteponen intereses económicos y corporativos al cuidado del ambiente debido al sistema neoliberal capitalista que ha condicionado y limitado las gestiones de las instituciones gubernamentales para el cuidado del ambiente, ya que los proyectos de este modelo económico no dan alternativa al cuidado y uso racional de los recursos naturales como los ríos (Sarabia *et al.*, 2011; González & González, 2010; Gordillo *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010; Durand, 2014).

Por lo anteriormente descrito, entre los ríos más contaminados de México se encuentran el Alto Balsas (Puebla y Tlaxcala), cuya problemática ambiental ha sido resultado de una amplia y sostenida expansión demográfica derivada a su vez del prominente desarrollo económico de los estados de Puebla y Tlaxcala que abarcan una extensión superficial de aproximadamente 2429 km² y es una zona con gran variedad de actividades industriales entre las que destacan la de alimentos, textil, automotriz, papelera, metalúrgica,

metalmecánica y farmacéutica, además de mantener una extensa actividad agrícola (Sarabia *et al.*, 2019). Todas estas actividades producen grandes cantidades de aguas residuales compuestas por mezclas complejas de agentes xenobióticos las cuales no son controladas debido a la falta del cumplimiento de las normas mexicanas por parte de las industrias en complicidad con la apatía de las autoridades responsables de hacer cumplir dicha normatividad (CONAGUA, 2010).

Otros ríos en México que se encuentran en la misma situación son el río Lerma-Santiago (Estado de México, Guanajuato, Michoacán y Jalisco), el río Colorado (Baja California y Sonora) y Alto Panuco (Tamaulipas y Veracruz) que tienen como principales fuentes contaminantes las aguas residuales, los lixiviados de basureros y los escurrimientos agrícolas resultado del intenso y desordenado crecimiento industrial y urbano (Greenpeace, 2013).

Los principales agentes contaminantes que se encuentran en los ríos de México son metales tóxicos, compuestos orgánicos como tolueno y benceno, materia orgánica y coliformes totales (Greenpeace, 2012; Pérez *et al.*, 2018). Los metales tóxicos pesados tienen una alta persistencia en el ambiente debido a que no pueden ser biodegradados por lo que representan un serio problema para los organismos expuestos a ellos. Los efectos de estos elementos en los organismos biológicos se manifiestan principalmente en perturbaciones de sus biomoléculas proteicas con actividad en los sistemas enzimáticos debido a esto inducen patologías multisistémicas en los organismos (Calva & Torre, 2003), afectando órganos vitales de los organismos entre los principales sistemas afectados están el neurológico gastrointestinal, hemático y renal (Ferrer, 2003). Algunos compuestos metálicos a largo plazo tienen la capacidad de alterar la estructura genética de ADN produciendo tipos de cáncer (Polo, 2019).

Con relación a los COV's como tolueno y benceno sus efectos en la salud de los organismos incluyen irritación en las vías respiratorias, cefaleas, disminución de las funciones pulmonares y lesiones en órganos como hígado y riñón. Sus efectos en las plantas incluyen alteración del proceso de fotosíntesis (RISCTOX, 2010). Algunos COV's tienen efectos cancerígenos como el benceno. Investigaciones como las de Montero (2006) concluyen que la exposición a este tipo de compuestos induce efectos genotóxicos como la rotura de cromosomas, puentes cromosómicos y micronúcleos, además de daños en eritrocitos de habitantes expuestos a este tipo de compuestos orgánicos. Otros estudios como el realizado por Sandoval (2009) confirmó que la presencia de COV's son corresponsables de la mutagenicidad en microorganismos como *Daphnia magna* y *Salmonella typhimurium*.

En relación con el exceso de contenido de materia orgánica en los cuerpos de agua, sus efectos son bien conocidos, pueden provocar la disminución en la concentración del oxígeno disuelto en el agua lo que ocasiona que los organismos acuáticos compitan por el oxígeno y como resultado se ve afectada la supervivencia de los organismos acuáticos (FCEA, 2007). La presencia de coliformes indica contaminación por residuos fecales provenientes de la infiltración de heces de ganado en campos abiertos o bien debido a descargas de aguas residuales domesticas vertidas sin tratamientos que cumplan con los requerimientos normativos (Rivera *et al.*, 2007). Las enfermedades que pueden provocar

las bacterias coliformes son gastroenteritis y disentería que atacan al sistema digestivo (Ramos, 2008).

2.3.1.1. Contaminación en el Alto Balsas.

La Región Hidrológica – Administrativa IV del Balsas está constituida por la Región Hidrológica No. 18, se ubica entre los paralelos 17° 13' y 20° 04' de latitud Norte y los meridianos 97° 25' y 103° 20' de longitud Oeste. Cuenta con una superficie hidrológica de 117,405 kilómetros cuadrados, equivalente al 6% del territorio nacional (CONAGUA, 2010). La región hidrológica del Balsas desde el punto de vista geohidrológico es considerada como una zona subexplotada, sin embargo, en ella se ubican algunas áreas sobreexplotadas, con disponibilidad de agua limitada y altamente contaminada. Las principales áreas de explotación se ubican en las mayores concentraciones urbanas de Puebla, Tlaxcala y Cuernavaca de la subregión del Alto Balsas y Lázaro Cárdenas en la subregión Bajo Balsas. En la década de los 70 se dio un gran impulso industrial en México de manera que se crearon corredores industriales en la regional principalmente en las ciudades de Puebla, Tlaxcala, Ciudad del Valle en Cuernavaca y la de Lázaro Cárdenas (CONAGUA, 2010). La problemática de la contaminación y escasez del agua en la cuenca ha sido provocada en su mayor parte debido al crecimiento de la población que demanda cada vez más mayores volúmenes de agua para los diferentes usos como el urbano, agrícola e industrial.

Desafortunadamente el desarrollo económico de la región del Balsas no ha sido planificado atendiendo el aspecto ambiental y social. Debido a esto se han desentendido por parte del gobierno el cumplimiento de las leyes para preservar el recurso hídrico, el combate a la pobreza y la seguridad alimentaria (Valencia, 2015).

Además, las tendencias en las regiones más desarrolladas indican un acelerado crecimiento urbano con frecuencia sin el debido ordenamiento territorial que trae como consecuencia la presencia de asentamientos irregulares factor que agudiza la problemática de la contaminación hídrica. La Región Hidrológica del Balsas de manera general presenta una alta polarización de los recursos para el desarrollo económico, humano y tecnológico en las diferentes regiones que la conforman (CONAGUA, 2010).

El Alto Balsas pertenece a una de las regiones hidrológicas más grandes de México la del Balsas que está ubicada en la región central del país, a su paso riega 8 de los 32 estados mexicanos. La región del Alto Balsas discurre por los estados de Puebla, Guerrero, México, Morelos, Tlaxcala y Oaxaca abarcando un área de 50 464 km² y concentra aproximadamente el 7 % del total de la población de México (CONAGUA, 2011; INEGI, 2019). El Alto Balsas es una región muy importante para la biodiversidad mexicana por los altos niveles de especies endémicas que lo habitan. Desafortunadamente también es de las subregiones hídricas que mayor pérdida de hábitat ha tenido debido a los altos índices poblacionales y de actividades antropogénicas que ha presentado en los últimos 30 años (Vázquez *et al.*, 2018). Aunque la región mantiene grandes extensiones forestales conservadas, alrededor del 20 % de la cobertura vegetal ha sido cambiada por suelos agropecuarios, asentamientos humanos e industriales (Naturam, 2016). Debido a esta concentración poblacional se han generado grandes cantidades de aguas residuales y por

lo tanto aumento en los niveles de contaminación acuática que es uno de los mayores problemas de la cuenca y cuya mayor representación está en la zona conocida como Alto Atoyac (Valencia, 2008).

Las otras 2 subregiones del Balsas son el medio y bajo Balsas que en conjunto representan el 2.7 % de la población del país, sin embargo, abarcan aproximadamente 66 841 km² de área hidrológica que transcurre por los estados de Guerrero, Jalisco, México y Michoacán. Debido a estas características hidrográficas y poblacionales desde 1966 su principal vocación es la generación de energía eléctrica principalmente en el tramo final de la cuenca entre los estados de Michoacán y Guerrero (Sarabia *et al.*, 2019). La región del medio y bajo balsas es de carácter rural sin presencia de poblaciones mayores a 10 mil habitantes. Debido al alto número de poblados menores a 1500 habitantes, la densidad poblacional presenta un alto grado de dispersión (INEGI, 2019). Es una de las regiones del país con mayor rezago en las necesidades de salud, empleo, educación, desarrollo social y cultural

Las condiciones climáticas y de relieve restrictivas, junto con la carencia de medios económicos y tecnológicos han limitado fuertemente las actividades productivas. El modelo de desarrollo agropecuario impulsado por la intensificación agrícola de los últimos 30 años no ha sido posible en esta zona, por lo que las poblaciones campesinas locales han continuado un proceso de adaptación a los ritmos estacionales, orientando sus actividades productivas para dar cuenta de las ventajas existentes en los recursos que aparecen disponibles en diferentes zonas del área y en diferentes épocas del año (Burgos *et al.*, 2010).

En consecuencia, las actividades productivas han tenido bajo impacto sobre la cubierta vegetal con tasas muy bajas de deforestación del bosque nativo, razón por la cual la zona se encuentra en un estado de conservación biológica muy alto. Paradójicamente a esta riqueza biológica y la pobreza económica están asociada en el mismo territorio (Kieffer, 2014).

2.3.1.2. Origen de la contaminación del río Atoyac en SMT y TL.

La contaminación intensiva del río Atoyac en la zona de transición de los municipios de San Martín Texmelucan, Puebla y Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala inicia en la década de los 40's cuando el Estado Mexicano bajo el pretexto del reparto agrario propicia el drenaje de tierras indudables en las riberas del río Atoyac de las zonas de San Martín Texmelucan (SMT), Villa Alta (VA) y San Mateo Ayecac (SMA) que hasta esos años habían servido de reserva de humedad para el riego agrícola. La intención del gobierno fue derivar el agua de los humedales y del río entre los estados de Puebla y Tlaxcala a las nacientes fábricas que se establecían a orilla de la corriente del Atoyac, principalmente la textil (Cerecedo, 2020) y para la satisfacción de las necesidades de limpieza personal de la población (Acua, 2016; Hernández, 2021).

Hasta entonces la agricultura había sido desde la época colonial la principal actividad que dio renombre y sostuvo la economía de los pueblos de SMT y TL. Después del reparto agrario a inicios de los años 70 comienza un cambio acelerado de SMT convirtiendo su base económica agrícola a industrial y este proceso se ve consolidado en la década de los

ochenta con el establecimiento del corredor industrial Quetzalcóatl. De la misma forma el municipio de TL por esos años comenzó a presentar un incremento de establecimientos industriales. En 1970 en el municipio sólo existían cuatro establecimientos, ya para el 2021 de acuerdo con la Secretaría de Desarrollo Económico (SEDECO), la cifra alcanzó 1701 establecimientos de los cuales, 290 son manufactureros (Tome, 2017). Las diferentes estrategias económicas globales, como el neoliberalismo, implementadas en los últimos 40 años en las comunidades de América Latina han producido, y seguirán produciendo mientras persista el modelo una serie de transformaciones que han afectado las dimensiones de su vida social y ambiental-(Tome *et al.*, 2017), ya que desde su inicio y hasta la actualidad el sistema neoliberal ha tenido como primicia optimizar las ganancias de los capitalistas, sin atender la sobreexplotación de los recursos naturales y humanos (Vallejo, 2017).

Los municipios de SMT y Tepetitla de Lardizábal (TL), son ejemplo claro de este proceso que ha incidido directamente en una parte de la cuenca alta del Atoyac transformando espacios agrícolas en una amplia variedad de usos de suelo en donde la agricultura, industria y ciudad coexisten en tiempo y lugar, compitiendo por el uso de suelo y agua, modificando el territorio e influyendo en la organización social, ambiental e incluso cultural (Morales, 2004; Mora, 2021).

De acuerdo con Zambrano (2021) el factor principal por el cual las empresas eligieron la zona del Alto Atoyac para establecerse fue debido a la enorme abundancia de agua superficial y subterránea necesaria para abastecer sus procesos y, por otro lado, porque vieron la oportunidad de verter sus aguas de desecho sin tratamiento en los numerosos cauces naturales como ríos, arroyos, canales, zanjas e incluso campos de cultivo. Con el pasar del tiempo esta situación se agravó debido a que las empresas que fueron absorbidas por las zonas urbanas que crecieron aceleradamente comenzaron a utilizar las redes de agua municipal para el vertido de sus aguas residuales.

La mayoría de los autores que han evaluado la contaminación la calidad del agua en el río Atoyac (Saldaña, 2006; Sandoval *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2019; Pérez *et al.*, 2018; Navarro *et al.*, 2017) coinciden que la causa principal de la contaminación es el factor económico representado principalmente por el sector industrial, sin embargo, toda problemática ambiental como la que existe en esa zona no es meramente ecológica, es multifactorial con repercusiones sociales, políticas y culturales que se interrelacionan y confluyen desencadenando conflictos socio ambientales complejos (Gómez *et al.*, 2011).

Las aguas del río Atoyac formaban lagunas y humedales que eran aprovechados por la población para la agricultura y eran ecosistemas con una gran variedad de flora y fauna. De acuerdo a los registros arqueológicos, la cuenca del río Atoyac contaba con diversas poblaciones de aves como patos, grullas y guajolotes; mamíferos como zorrillos, ratones, conejos, ardillas, lobos, venados y animales acuáticos como peces, ranas y tortugas. Respecto a la flora los registros indican la existencia de plantas comestibles y medicinales como los quelites, el amaranto y nopales (Olvera, 2017).

Así que uno de los primeros daños al ecosistema debido al drenaje de los humedales para el sector industrial fue la desaparición de esos ecosistemas acuáticos y de su biodiversidad. Situación que afectó servicios ecosistémicos que proporcionaba el río hace 80 años como

provisión de alimento, agua potable que podía utilizarse para el riego de cultivos, usos domésticos e incluso actividades recreativas (Rodríguez *et al.*, 2014). A consecuencia de las descargas tanto de origen industrial como municipal sin tratamiento, el río Atoyac en las localidades de SMT y TL ha sido envenenado con una enorme cantidad de agentes xenobioticos como cloroformo, tolueno, metales pesados, solidos suspendidos, coliformes y muchas otras sustancias que forman mezclas complejas toxicas que han aniquilado la vida acuatica del ecosistema del río (Saldaña, 2002).

Pero la contaminación ambiental del río Atoyac no sólo afecta al agua, puede extrapolarse a otros comportamientos como el suelo, de acuerdo con Gonzalez (2019) las aguas del río Atoyac contienen considerables concentraciones de iones toxicos provenientes de las aguas residuales como boro, fluor, cloro y bicarbonatos que afectan a algunos cultivo que han sido prohibidos como el los de hortalizas, frutas y legumbres (Bonilla *et al.*, 2014) .

Otros estudios como los realizados por Castro (2017) y Mancilla *et al.*, (2012) demostraron que los cultivos que son irrigados con agua del río son contaminados con MP provenientes actividades antropicas, y tienen la capacidad de acumularse a largo plazo en el suelo ser absorbidos por las plantas y así incorporarse en la cadena trófica a niveles toxicos (Cortés, 2021) y ocasionar graves problemas de salud como problemas gastrointestinales (Aburto, 2017), casos de anemia (Valencia *et al.*, 2011), daños a nivel molecular como expresión de micronúcleos y estrés oxidativo (Montero *et al.*, 2020) hasta casos extremos de insuficiencias renales y cáncer (Pichardo 2021; Ayala, 2021).

Hernández (2021) reportó que los desechos provenientes de las lavanderías de mezclilla son vertidos al drenaje publico que a su vez llegan directamente a la corriente del río Atoyac sin tratamiento alguno en zonas de riego que afectan directamente la producción agrícola de la region.

De manera que el agua del río Atoyac no sólo representa un riesgo ecologico también representa un riesgo a la salud de los seres humanos ya que no cumple con los LMP por las NOM establecidos para los parametros de sustancias xenobioticas altamente toxicas las cuales tienen la capacidad de inducir daños en los sistemas biologicos (García *et al.*, 2011). Al respecto se han reportado en personas no expuestas ocupacionalmente o laboralmente a elementos tóxicos pero cercanas al río casos leucemia, púrpura trombocitopénica e insuficiencia renal. Montero *et al.*, (2006) y Sandoval *et al.*, (2009) determinaron daño genotoxico en la población expuesta al medio ambiente contaminado del río situación que esta relacionada con mecanismos de acción a nivel celular de los contaminantes en la inducción de procesos cancerígenos.

2.3.1.3. Problemática ambiental actual de la contaminación del río Atoyac en San Martín Texmelucan y Tepetitla de Lardizábal.

La problemática de la contaminación ambiental del río Atoyac es resultado del deterioro inducido por el crecimiento poblacional sostenido y el desarrollo económico de los estados de Puebla y Tlaxcala que están asentados en aproximadamente en 2400 km² de extensión territorial de la subcuenca del Alto Atoyac (figura 1).

En el municipio de Tlahuapan, Puebla el río Atoyac tiene su primer contacto con aguas residuales provenientes de actividades antrópicas, posteriormente es el municipio de San Martín Texmelucan, Puebla donde se aprovecha esta corriente hídrica para actividades agrícolas, domésticas e industriales, y donde se ubican corredores industriales como el complejo petroquímico Independencia de PEMEX, el parque industrial Quetzalcóatl que incluye empresas textiles, metalmecánicas, químicas, papeleras y de alimentos que descargan en el río sus aguas residuales.

A continuación, se ubican las localidades de Villa Alta y de San Mateo Ayecac pertenecientes al municipio de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, las cuales también contribuyen intensamente a la contaminación del río con enormes volúmenes de agua residual, sin tratamiento previo, provenientes principalmente de lavanderías de mezclilla (Juárez, 2016). En total en esta zona se han contabilizado 73 descargas industriales y 10 municipales (Sarabia *et al.*, 2019), que de acuerdo con Registro Público de Derechos de Agua (REPGA) vierten en promedio 306.5 L s^{-1} de agua residual al cauce del río.



Figura 1. Ubicación geográfica de la subcuenca del Alto Atoyac. Tomado y modificado de INEGI (2019).

El río Atoyac es considerado el segundo más contaminado de México y no reúne las condiciones de calidad que pudiera hacerlo apto para el uso de sus aguas y sustentar vida acuática debido a que contiene altos niveles de materia orgánica y agentes xenobióticos como metales pesados (Cd, Pb, Hg, Zn y Ni), materia orgánica (fosfatos y nitratos) y compuestos orgánicos (cloroformo, tolueno y xileno) que tienen la capacidad de inducir daño en los sistemas biológicos y cuyos efectos adversos son estudiados por la toxicología (Repetto & Repetto, 2009).

2.4. Toxicología.

La toxicología estudia los efectos nocivos de los agentes químicos, biológicos y físicos en los seres vivos, estableciendo la magnitud del daño en función de la concentración y del tiempo de exposición de los organismos a dichos agentes. Además, busca identificar, prevenir y tratar las enfermedades derivadas de dichos efectos (Roldan, 2016). Uno de los principales objetivos de la toxicología es resolver situaciones en las que se pone en peligro la vida de un ser vivo, debido al efecto nocivo de agente pernicioso conocido como tóxico (Gutiérrez & López, 2001).

Un tóxico es todo agente químico, físico o biológico que, tras generarse puede entrar en contacto o ser adsorbido por un organismo en dosis suficiente que puede producirle un efecto adverso directo (Roldan, 2016). El aumento de las actividades antropogénicas ha propiciado la generación de sustancias químicas para diversos propósitos causando la emisión de contaminantes en aire, agua, alimentos y otras partes del ambiente que pueden inducir daños en la salud o incluso la muerte en organismos a través de un proceso conocido como toxicidad.

Entre los tóxicos más comunes figuran los fármacos, las sustancias químicas industriales, metales pesados, plaguicidas, compuestos orgánicos volátiles y no volátiles (Silbergeld, 2014). Entonces la toxicidad es la capacidad de alguna sustancia química o agente físico para producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo. Es importante mencionar que la respuesta tóxica, es decir el daño que puede sufrir; dependerá de la concentración, así como del tiempo de exposición al tóxico, (Peña, 2004).

Debido a la problemática que representa la contaminación de los ecosistemas acuáticos las agencias de control ambiental han estandarizado metodologías para determinar el grado de deterioro de los recursos hídricos que incluyen la toma de muestras periódicamente para determinar la calidad del agua (Iqbal, 2016). Sin embargo, los estudios de calidad del agua en Latinoamérica se enfocan en su mayoría en evaluar parámetros fisicoquímicos y microbiológicos como lo indican las directrices establecidas por las normas vigentes. Desafortunadamente este tipo de evaluaciones no dicen nada con respecto a los posibles daños que el agua contaminada puede inducir en los organismos y ecosistemas expuestos a ella. Además, que es sumamente complejo cuantificar los múltiples efectos en los organismos de la totalidad de los compuestos presentes de mezclas complejas de contaminantes presentes en muestras ambientales (Roldan, 2016; Sykora *et al.*, 2021).

Por lo anterior ha sido necesario incorporar otro tipo de herramientas en los análisis de calidad como son las evaluaciones toxicológicas. Para lo cual se han estandarizado los bioensayos que son metodologías que ayudan a determinar los efectos agudos o crónicos, en organismos biológicos, ya sea de sustancias conocidas, o de muestras ambientales de composición compleja e incierta. Estas pruebas miden los efectos de uno o varios contaminantes mezclados sobre un tejido u organismo y consisten en exponer a dichos organismos a diferentes concentraciones de los agentes tóxicos con el propósito de determinar algún cambio cuantificable en ellos en un periodo de tiempo dado (Silva *et al.*, 2007). Los cambios o respuestas evaluadas pueden cubrir un amplio rango de niveles de organización, desde un nivel molecular y bioquímico hasta anatómico, fisiológico o

conductual (Ferrari, 2015). A estos cambios en toxicología se les conoce como biomarcadores que son parámetros que proveen información sobre el estado normal o patológico de un individuo o incluso de una población entera que haya estado expuesta a un ambiente contaminado (Arango, 2012).

Las evaluaciones toxicológicas a través de bioensayos y determinación de biomarcadores ayudan a entender y predecir los efectos de agentes tóxicos tanto físicos o químicos presentes en el ambiente, en los organismos que son parte esencial de los ecosistemas como vegetales, microorganismos, animales y al ser humano (Sykora *et al.*, 2021). Los agentes tóxicos pueden ocasionar daño en el material genético o bien ocasionar alteraciones en el ciclo celular de los organismos. El daño en el material genético incluye no sólo a la molécula de ADN, sino también a las proteínas que están relacionadas con la funcionalidad de los cromosomas dentro de la célula como las histonas o la tubulina que participan en la condensación, descondensación y movimiento de cromosomas. A los agentes que tienen la capacidad de ocasionar daño en el material genético se les conoce como genotóxicos. Por otro lado, hay agentes tóxicos que inducen efectos adversos en los procesos esenciales en la proliferación celular son los llamados agentes citotóxicos (Abrevaya, 2008).

2.5. Citotoxicidad

El estudio de la citotoxicidad tiene su base en la observación del ciclo celular y específicamente en el análisis de la mitosis, ya que es el momento en el que se producen las alteraciones morfológicas de las células a consecuencia del efecto de agentes físicos, químicos o biológicos (figura 2) con la capacidad de inducir efectos adversos sobre las funciones del ciclo celular y a esta condición se le denomina citotoxicidad (Walum, 1998).

El índice mitótico (IM) es un biomarcador clásico de la toxicología genética que junto a otros como la prueba cometa y la prueba de micronúcleos nos ayudan a determinar la presencia de agentes citotóxicos en el ambiente (López *et al.*, 2009). La mayor parte de las alteraciones inducidas por xenobióticos tienen su origen en interacciones inespecíficas con diferentes estructuras subcelulares y corresponden por lo tanto a procesos de citotoxicidad basal (Ekwall, 1995).

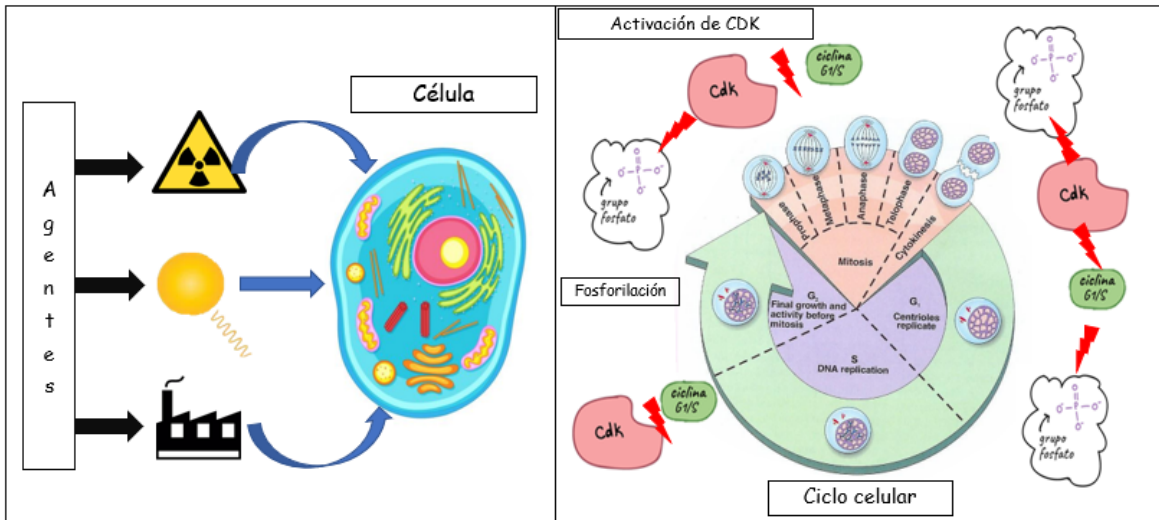


Figura 2. Los agentes contaminantes modifican el ciclo celular. Tomado y modificado de Raven (2014).

2.5.1. Ciclo celular

Entre las sustancias con mayor efecto citotóxico están los pesticidas, los aditivos de alimentos, los derivados de la combustión incompleta de productos como la gasolina, compuestos orgánicos volátiles presentes en solventes industriales y los metales pesados, que en general tienden a bioacumularse y unirse de forma covalente a moléculas de proteínas y ADN. Esta unión produce estrés oxidativo que provoca inhibición de los mecanismos de reparación del ADN (Srivastava & Thakur, 2006; Fevzi *et al.*, 2007).

El ciclo celular comprende una serie de eventos o etapas que ocurren dentro de la célula durante su desarrollo y división. Una célula pasa la mayor parte de su tiempo dentro del sistema llamado interfase y consta de tres etapas G1, S, G2, en las que ocurre el crecimiento de la célula y una amplia actividad metabólica. Una vez finalizada la organización de la interfase, la célula entra en mitosis y completa su división (Imoto *et al.*, 2021).

La mitosis es el proceso de reproducción de una célula que consiste, fundamentalmente, en la división longitudinal de los cromosomas y en la división del núcleo y del citoplasma; como resultado se constituyen dos células hijas con el mismo número de cromosomas y la misma información genética que la célula madre (Zapata, 2001).

El ciclo celular está regulado por un grupo de proteínas llamadas ciclinas. Existen cuatro tipos básicos: ciclinas de G1, ciclinas de G1/S, ciclinas de S y ciclinas de M. Cada fase se caracteriza por tener una ciclina específica que ayuda a desencadenar una serie de eventos propios de la fase. Tal es el caso de la ciclina M que desencadena la disolución de la membrana nuclear y la correspondiente condensación de los cromosomas (Reece *et al.*, 2011). De igual manera, la familia de proteínas llamadas quinasas dependientes de ciclina (CDK) están ubicadas en el núcleo y el desarrollo del ciclo celular depende de su actividad. Los principales eventos del ciclo celular son (replicación del ADN, mitosis y citocinesis). Por ejemplo, el aumento de la actividad de Cdk en las primeras etapas de la mitosis conduce a

un aumento de la fosforilación de proteínas que controlan la condensación cromosómica, la destrucción de la envoltura nuclear y el ensamblaje del huso (Raven *et al.*, 2014).

Para promover el ciclo celular, la ciclina activa o inactiva a muchas proteínas blanco en el interior de la célula, y depende de las señales que recibe del medio extracelular o intracelular con el objetivo de desencadenar una cascada de acontecimientos característicos de cada fase, siempre y cuando en el medio no existen compuestos o sustancias que inhiban el desarrollo normal del ciclo celular.

Durante la división celular, el ADN se replica y divide, originando en dos células hijas con idéntico material genético a la célula madre, sin embargo, cuando este proceso de división celular se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, se presentan errores durante la replicación del ADN, que ocasiona pérdida de cromosomas, provocando alteraciones cromosómicas estructurales tales como: roturas de ADN, inhibición de la síntesis de ADN y replicación de ADN alterado (Russell, 2002).

Se han llevado diversos estudios acerca de cómo los agentes xenobióticos como los metales pesados como el Cr^{+6} tienen la capacidad de atravesar la membrana celular y una vez en el interior diversos agentes como el ascorbato, el glutatión y la cisteína lo reducen a Cr^{+5} , Cr^{+4} y Cr^{+3} . Durante el proceso de reducción intracelular del cromo se generan ERO y RL que tienen la capacidad de interactuar con el ADN e inducir efectos citotóxicos como rompimiento de cadena sencilla y doble, oxidación de bases nitrogenadas y formación de aductos (García *et al.*, 2014). Otro tipo de xenobióticos los COV's que son absorbidos por vía inhalatoria han mostrado efectos antimitóticos inhibiendo la formación de células inmunohematológicas ocasionando disminución en la cuenta de leucocitos, eritrocitos y plaquetas en personas expuestas a este tipo de compuestos.

Compuestos orgánicos contenidos en solventes como xileno y benceno una vez que ingresan al organismo desencadenan reacciones detoxificantes por medio de actividad enzimática como la del citocromo P450. Este proceso genera RL y ERO que como ya ha sido mencionado pueden inducir estrés en la célula causando daños en el ADN (Haro *et al.*, 2008). Por otra parte, los solventes con altos contenidos de COV's tienen la capacidad de inducir efectos clastogénicos, cancerígenos y teratogénicos. En especial el benceno por ejemplo exhibe propiedades inmunotóxicas, hematóxicas, citotóxicas y genotóxicas y está asociado con la leucemia (Varona *et al.*, 2020).

Con el incremento de los compuestos xenobióticos en el ambiente se ha hecho necesario establecer metodologías para la valoración de los efectos que pueden causar los agentes contaminantes en la estructura celular como daños a la membrana o citoesqueleto, así como también daño a la funcionalidad como proliferación, metabolismo, síntesis y división celular (Cortijo, 2013).

El potencial de citotóxico de un contaminante puede determinarse mediante el uso de bioindicadores, método basado en la propiedad que tienen ciertos organismos o poblaciones celulares de detectar la presencia de contaminantes en un medio (Beltrán & Gonza, 2017). Sin embargo, la relevancia de la información obtenida a partir de los

bioindicadores o biomonitores de citotoxicidad depende en gran medida de la sensibilidad del modelo experimental, así como de las técnicas empleadas (Donato *et al.*, 1995).

Por último, para estudiar el potencial citotóxico la rama de la ecotoxicología nos permite aplicar diferentes estrategias tanto *in situ* como *in vitro*, ya que muchos organismos (vegetales, animales, bacterias, etc.) permiten detectar con anticipación signos de efectos citotóxicos antes de que impacten en las poblaciones o en los ecosistemas. (Jovanovic *et al.*, 2018).

2.5.1.1. Pruebas para evaluar citotoxicidad

Como se mencionó la citotoxicidad es un parámetro que cuantifica efectos tóxicos en una célula. Y para comprender esta relación se llevan a cabo una serie de pruebas que miden la tasa de proliferación y los efectos tóxicos en la célula (EUROLAB, 2017). Existen diferentes métodos que se pueden emplear para cuantificar citotoxicidad. De manera general podemos mencionar dos métodos *in vivo* e *in vitro*.

Pruebas *in vitro*: Estas pruebas son relativamente rápidas y proporcionan una evaluación valiosa sobre la toxicidad de muchos compuestos para determinar su efecto sobre la proliferación celular y efectos antioxidantes. Se realizan fuera de un organismo vivo normalmente en tejidos o células aisladas (Acevedo *et al.*, 2013) como los cultivos celulares en los cuales las líneas celulares de un organismo determinado son expuestas a diferentes concentraciones o intensidades de un agente tóxico, posteriormente se determina la viabilidad celular de la muestra que es la proporción de células vivas y funcionales existentes en la población celular de la muestra (Milena *et al.*, 2005).

Pruebas *in vivo*: Sistemas biológicos vivos en animales y vegetales altamente sensibles se han utilizado como modelos para la evaluación de riesgos toxicológicos ambientales. Se ha reportado el uso de vertebrados *Salmo trutta* L., *Danio rerio*, *Cyprinus carpio* y *Bagre marinus*. En cuanto a los vegetales los más utilizados en pruebas de citotoxicidad son *Hordeum vulgare* L., *Vicia faba.*, y *Allium cepa* L., quienes, por sus reducidos genomas diploides de 14, 12 y 16 cromosomas respectivamente se han convertido en biomonitores de nivel citotóxico y genotóxico de contaminantes ambientales (Beltrán & Gonza, 2017).

2.5.1.2. Biomonitores de citotoxicidad: *Allium cepa* y *Danio rerio*.

La cebolla (*Allium cepa* L.) se emplea para evaluar la calidad del agua. Cuando un bulbo de cebolla se expone a la hidratación se produce el crecimiento de sus raíces debido a la estimulación del crecimiento y la división de sus células. Sin embargo, si la hidratación de las raíces se lleva a cabo en presencia de agentes tóxicos el crecimiento y la división celular puede ser alterada, ya sea inhibiendo o acelerando el proceso de mitosis (López *et al.*, 2016).

Las pruebas con *Allium cepa* L., han sido muy utilizadas por los investigadores principalmente en estudios de contaminación ambiental, de extractos de cianobacterias, así como para evaluar los efectos citotóxicos de plantas medicinales, fármacos, conservadores, artículos de limpieza, etc. Es decir, son organismos que poseen una alta sensibilidad que

les permite detectar innumerables sustancias que pueden provocar alteraciones del ciclo celular y cromosómicas (Morais & Marín, 2009). Los datos que se obtienen de las pruebas pueden ser extrapolados para la biodiversidad tanto vegetal como animal. Adicionalmente el pez cebra se utiliza ampliamente en estudios toxicológicos para evaluar los efectos de la contaminación ambiental y su relación con la inducción del estrés oxidativo y la metabolómica en animales acuáticos y que en los últimos años ha sido un tema relevante en la caracterización de la interacción de los organismos con su entorno (Ding *et al.*, 2021).

Otro aspecto importante acerca de los estudios con el pez cebra radica en que su patrón de desarrollo es similar al de los vertebrados superiores, incluidos los mamíferos. (Moreno, 2013; Chen, 2006). Por lo que se han llevado a cabo muchos estudios con este biomodelo para la caracterización no solamente ambiental sino también de diversas patologías como enfermedades del hígado (Wang *et al.*, 2017); disturbios metabólicos (Kamel & Ninov, 2017); desarrollo y enfermedades de riñón (Jerman & Sun, 2017); enfermedades esqueléticas (Luderman & Unlu, 2017) entre otras.

2.5.2.1 Bioensayos.

Los bioensayos biológicos son herramientas cuyo objetivo es determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos son el resultado de diferentes respuestas del organismo, como defensa, ante agentes externos desconocidos tales como: inhibición, magnificación, crecimiento, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos. En la mayoría de los casos, al no poder el organismo mantener el equilibrio homeostático interno con respecto al externo sobreviene la muerte.

Por consiguiente, para poder detectar la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo, se llevan a cabo dos tipos de tratamiento: agudo y crónico. La toxicidad crónica es cuando el efecto de un agente físico o químico causa daño y tienen período de latencia y se manifiestan después de un largo tiempo. La toxicidad aguda de una sustancia química se refiere a los efectos adversos que se manifiestan a corto plazo desde horas hasta 5-10 días dependiendo del tipo de organismo. tienen su objetivo en identificar la concentración del tóxico que puede ser considerada como segura y no produce efectos adversos subletales.

2.5.2.2. Efecto tóxico sobre los sistemas biológicos animales.

La toxicidad aparente evaluada en un ensayo biológico es el resultado de la interacción entre la sustancia y el sistema biológico que afectan las propiedades químicas o físicas del sistema, y consecuentemente las condiciones de vida de los organismos. Los resultados de los bioensayos se refieren, en primer lugar, a los organismos usados en el ensayo y las condiciones estipuladas en el procedimiento de prueba. Los daños incluyen desde alteraciones morfológicas hasta efectos fisiológicos en los órganos que inciden en el normal funcionamiento del individuo.

2.6. Aparato branquial.

La branquia es el órgano respiratorio en los peces, su función principal es realizar el intercambio gaseoso, extraen el oxígeno del agua y expulsan el dióxido de carbono al medioambiente. En los peces óseos, las branquias sufren daños morfológicos y fisiológicos frente a altas concentraciones de contaminantes químicos, sólidos suspendidos y otras sustancias tóxicas (Torres *et al.*, 2010).

Debido a estas características, las branquias se utilizan como órganos diana para determinar biomarcadores de contaminación en los medios acuáticos (Fanjul & Hiriart, 2008). El conocimiento de la morfología y fisiología de las branquias es de suma importancia porque al describir sus características anatómicas y funcionales obtenemos nociones valiosas para poder entender las lesiones y enfermedades que sufren debido a diversos agentes contaminantes que son órganos que junto a riñones e hígado se consideran como órganos primarios útiles para evaluar el efecto de la contaminación (Bernet *et al.*, 1999).

2.6.1. Estructura y función de la branquia

La branquia se delimita por dos regiones bien definidas: el arco branquial y los filamentos (figura 3). El arco branquial es una estructura de tejido óseo cubierto por una membrana serosa, a través de él discurren los vasos sanguíneos como la arteria aferente la cual se ramifica en vasos, de mediano calibre que irrigan a los filamentos de menor calibre y avanzan hasta la punta de la lamela, transportando sangre para el intercambio gaseoso. El retorno de la sangre es a través de la arteria eferente del arco (figura 4).

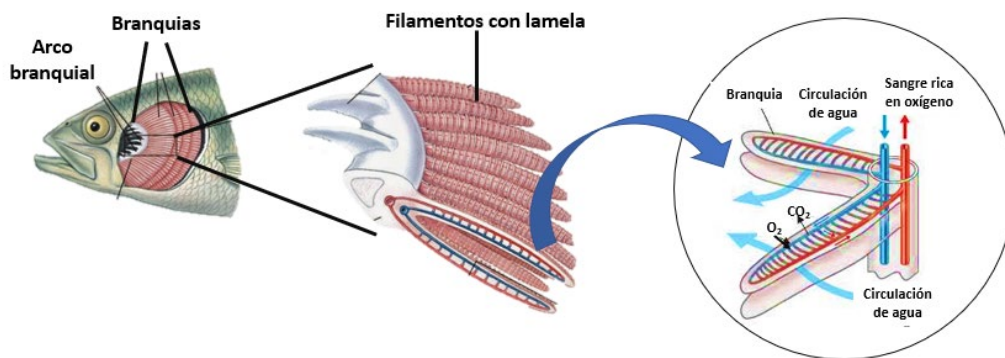


Figura 3. Sistema respiratorio en peces y estructura branquial. Tomado y modificado de Belmont (2010).

Junto al cartílago, en la base de los filamentos, se encuentra tejido muscular que les da movimiento a los filamentos para generar mayor turbulencia y facilitar el intercambio de gases. Sin embargo, el epitelio branquial es el lugar preponderante donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso, la regulación de iones y la excreción de los desechos, siendo así un órgano multifuncional vital para los peces (Evans, 1987).

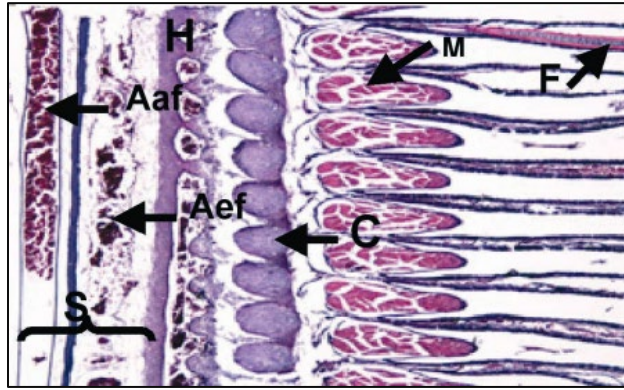


Figura 4. Vista microscópica de branquia. Capa serosa (S), arteria aferente (Aaf), arteria eferente (Aef), tejido óseo del arco (H), tejido cartilaginoso del arco (C), tejido muscular (M) y filamentos branquiales naciendo del arco (F). Tomado de Torres (2010).

Los efectos tóxicos de una amplia variedad de contaminantes acuáticos se pueden observar en las patologías branquiales tanto de tipo macroscópico como microscópico y a nivel molecular incluso. Las anomalías a nivel morfológico incluyen hiperplasia en filamentos, hipertrofia epitelial, dilatación de los vasos sanguíneos, edemas, descamación y necrosis del epitelio.

2.7. Estructura y función del hígado.

El hígado es el órgano metabolizador por excelencia de todas las sustancias que recibe por vía sanguínea, debido a esto, este órgano sirve como referente histológico para el análisis del daño tisular causado por agentes contaminantes en el ambiente (Amaral *et al.*, 2002). En los peces el hígado se encuentra bien desarrollado y sirve como depósito de glucógeno, de grasa, asimila nutrientes y sintetiza proteínas. Se localiza en la zona media de la cavidad abdominal (figura 5)

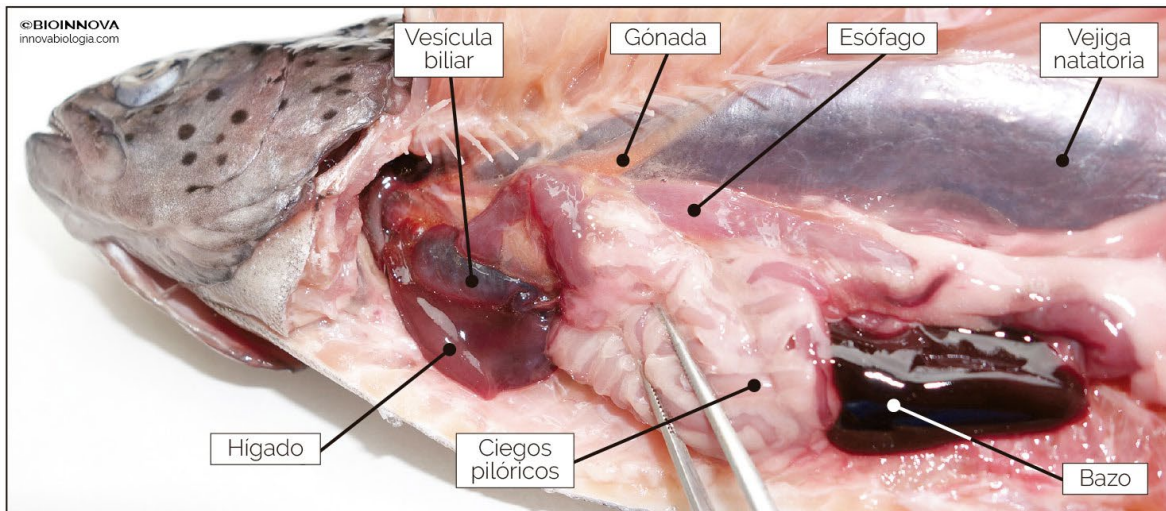


Figura 5. Ubicación del hígado en peces. Tomado de Bioinnova (2022).

El hígado está constituido por un estroma y un parénquima. El estroma es un tejido de sostén que recubre y protege al órgano. El parénquima está representado por dos

componentes anatómicos: el hepático y el pancreático. El componente hepático corresponde a una glándula mixta constituida por hepatocitos y a un sistema de conductos que drena bilis. Los hepatocitos son células poliédricas con un núcleo redondo que se organizan dando forma a los lobulillos hepáticos (figura 6). Los lobulillos son estructuras que se organización de forma hexagonal con tríadas portales en los vértices y en el centro una vena central.

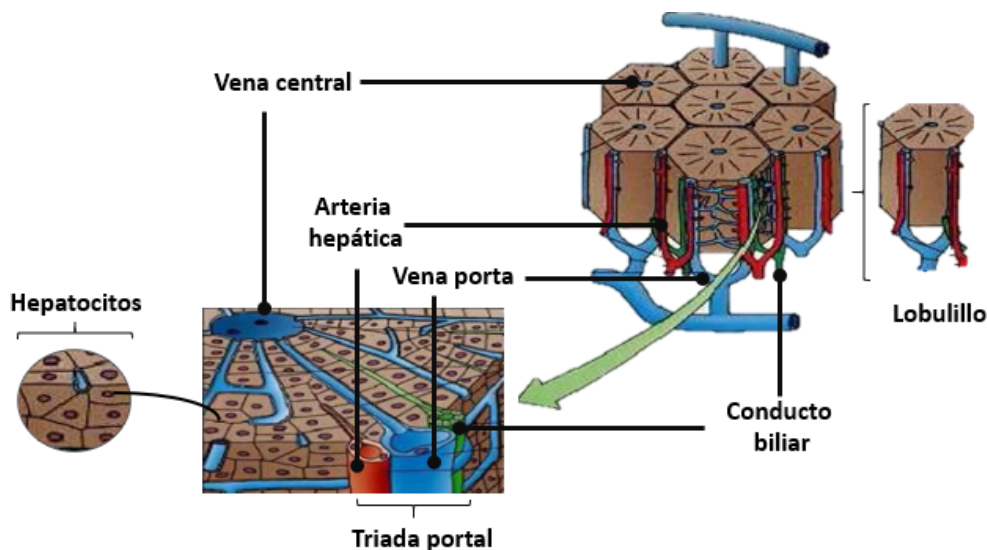


Figura 6. Estructura microscópica del hígado. Tomado y modificado de Ávila (2017).

Las venas centrales de todos los lobulillos convergen para formar la vena hepática, la cual transporta la sangre desde el hígado hacia la vena cava inferior (Acces Medicina, 2020).

Los hepatocitos forman hileras dejando espacios vasculares conocidos como sinusoides hepáticas. Asociado a la estructura de la sinusoide se encuentran macrófagos (células de Kupfer) que constituyen la primera línea de defensa del hígado. La membrana celular del hepatocito, en su superficie lateral forma vellosidades que se proyectan en el espacio ubicado entre el hepatocito y la sinusoide (espacio perisinoidal), donde se absorben moléculas del plasma sanguíneo cuyo flujo proviene de la vena porta y arteria hepática.

El análisis de la histopatología hepática, así como el uso de marcadores de función hepática en biomodelos tienen una amplia aplicación para evaluar la presencia de lesiones inflamatorias, tóxicas hepáticas y neoplasias inducidas por la presencia de agentes contaminantes en ecosistemas acuáticos, por lo que se han convertido en valiosas herramientas para el monitoreo y evaluaciones de riesgos ambientales (Lyons *et al.*, 2003; Schmalz *et al.*, 2002).

2.8. Efecto tóxico sobre los sistemas vegetales.

La contaminación impide el desarrollo y la supervivencia de muchas especies vegetales debido a que la presencia de sustancias tóxicas en el suelo, el agua y el aire alteran los procesos vitales de las plantas. Aunque cada especie vegetal es capaz de reproducirse y crecer en un rango de concentración de sustancias tóxicas presentes en el ambiente

(McNair, 1993; Farago, 1999), cuando las concentraciones de las sustancias tóxicas aumentan por encima del umbral de tolerancia de la especie, entonces se evidencian los efectos tóxicos, que conllevan a alteraciones fisiológicas con influencias negativas sobre el crecimiento y la estructura de la planta, incluso su muerte (Baker & Walker, 1989).

La toxicidad de los metales pesados (MP) en las plantas reduce su crecimiento, su actividad fotosintética, produce clorosis en sus hojas. También, interfiere en el transporte de nutrientes, ocasiona estrés oxidativo y afectaciones en su actividad enzimática (Hernández, 2016). Cuando la raíz de una planta se hidrata se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemas radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. De manera que este tipo de alteraciones impide el desarrollo normal de las raíces (figura 7). El efecto puede determinarse de forma indirecta, comparando el número de raíces y su elongación de las plantas expuestas a contaminantes contra plantas no expuestas (López *et al.*, 2016).

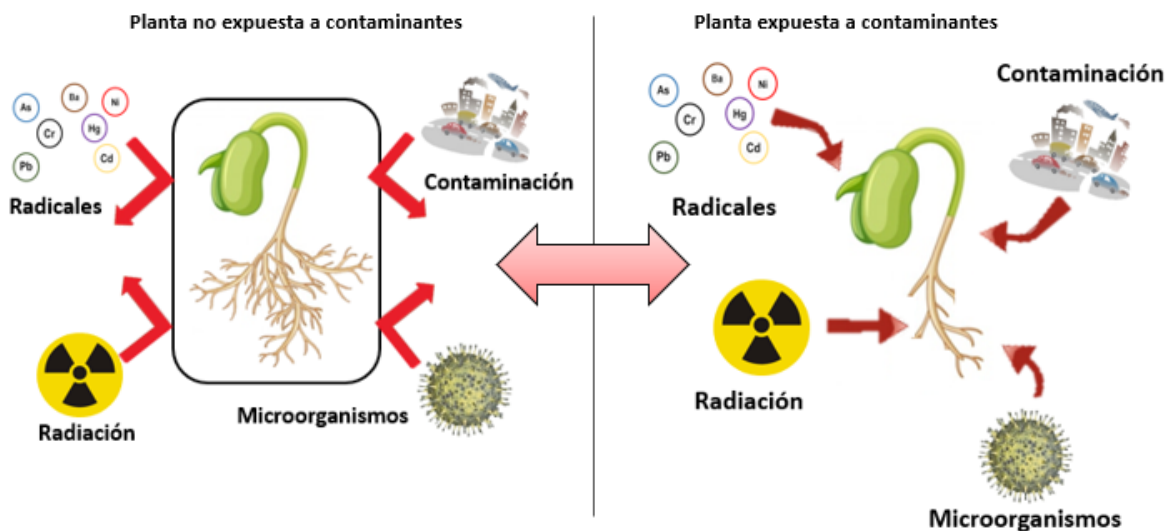


Figura 7. Efecto de agentes contaminantes en el sistema radicular de una planta. Elaboración propia.

Los sistemas biológicos vegetales como *Allium cepa*, *Vicia faba* o *Allium sativum* son inmensamente reconocidos como modelos para detectar compuestos contaminantes ambientales y evaluar sus efectos citotóxicos y genotóxicos que pueden ser observados y cuantificados a nivel macroscópico como el número de hojas, de raíces, largo de tallo, color, etc. Y a nivel microscópico nos pueden indicar alteraciones del índice mitótico, de fases y aberraciones cromosómicas de la población celular en sus raíces e incluso daños del ADN (Muñoz & Guerrero, 2013; López *et al.*, 2016; Dimuthu & Wadasinghe 2019).

2.9. Sistema radicular

El sistema radical de las plantas es el encargado de satisfacer varias de sus funciones como su anclaje en el sustrato, la absorción de agua y nutrientes, así como el almacenamiento de estos. La nutrición de las plantas está bajo control genético porque el funcionamiento de

los transportadores en las membranas de las células radicales presenta un proceso fisiológico altamente regulado por la actividad de los genes e influenciado por factores ambientales.

La estructura radicular comprende diferentes partes fáciles de identificar (figura 8):

Zona pilífera: Es la zona donde se localizan los pelos absorbentes y su función es absorber el agua y los minerales. Se forman constantemente en el extremo de la raíz, por lo que los más alejados del extremo son más largos existen hasta 2.000 pelos por cm².

Meristemo: se ubica a continuación de la zona pilífera, es la zona de continuo crecimiento o zona de división celular, donde ocurre el crecimiento de la propia raíz.

Caliptra: es el extremo de la raíz, es una cobertura blanda, cuya función es proteger la raíz mientras esta se abre camino por debajo del suelo, rodea al tejido meristemático y lo protege de roces y daños que pudiera sufrir en el camino por el suelo. La caliptra es una zona de constante crecimiento celular.

Epidermis: es la capa más externa de la raíz: su piel, como el nombre sugiere. Sus células producen los pelos radicales.

Córtex: es la capa siguiente a la epidermis. Su función es almacenar nutrientes en forma de almidón y entre sus células hay espacios que permiten el aireamiento de las mismas, y con ello la respiración.

Endodermis: en la capa más interna del córtex y se localiza alrededor del tejido vascular encontramos la endodermis, produce la sustancia llamada suberina, que permite la formación de la banda de caspari, que es impermeable, por lo que el agua circula en una sola dirección hacia el interior de la planta.

Cilindro vascular: En el centro se encuentra el cilindro vascular, con la xilema y el floema. La xilema transporta agua y minerales desde las raíces, mientras que el floema transporta el agua y carbohidratos desde los sitios de síntesis (Gutiérrez & López, 2001).

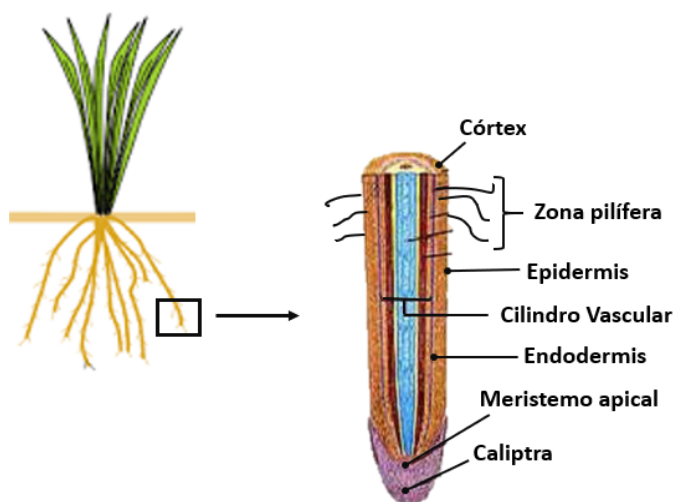


Figura 8. Partes de la raíz. Tomado y modificado de Acosta (2021).

2.9.1. La raíz como sistema de ensayo

Las raíces han constituido en un sistema de ensayo por ser un tejido proliferante debido a que las células meristemáticas son muy proliferantes y están en constante división celular, lo que permite analizar de manera rápida los efectos de agentes con potencialidad tóxica en la población celular radicular. Otra característica a considerar para utilizar la raíz durante la evaluación tóxica de agentes es la dinámica de formación de estructuras micro tubulares presentes en las células de las plantas superiores. En las plantas los microtúbulos desempeñan un rol fundamental en la morfogénesis y en la división celular (Kost, 1999). Las células meristemáticas, en particular, durante el ciclo de división presentan cuatro organizaciones de los microtúbulos principales asociados a las funciones de cada estadio.

Durante la interfase, los microtúbulos se encuentran ordenados en estructuras paralelas orientados de manera perpendicular al eje de expansión de la célula y dirigen la deposición de celulosa. En el inicio de la mitosis, estos microtúbulos se organizan en un anillo llamado banda pre profásica (BP) que rodea al núcleo donde define el plano de división y determina la ubicación de la placa celular formada durante la citocinesis. La BP es posteriormente reemplazada por la formación del huso mitótico (HM) que al unirse con el cinetocoro de los centrómeros permite la segregación de las respectivas cromátides a dos polos distribuyendo la información genética en las células hijas (Yu *et al.*, 2000).

2.10. Estrés oxidativo/nitrosativo

Se entiende por estrés oxidativo/nitrosativo a la toxicidad causada debido a especies reactivas de oxígeno ERO y de nitrógeno ERN que en ambos casos ocasiona un desequilibrio global en un sistema biológico entre el efecto de las especies oxidantes y nitrosantes y los sistemas de defensa antioxidantes (González, 2019). Cuando este desequilibrio ocurre se produce un exceso de especies reactivas conocidas como radicales libres. Durante los procesos de estrés oxidativo y nitrosativo los radicales libres reaccionan con las biomoléculas de la célula, como las proteínas, ácidos grasos, carbohidratos y los ácidos nucleicos (figura 9). De modo que este tipo de estrés altera los procesos bioquímicos celulares alterando su función biológica e incluso derivar en mecanismos de muerte celular programada también conocida como apoptosis (Hernández *et al.*, 2014).

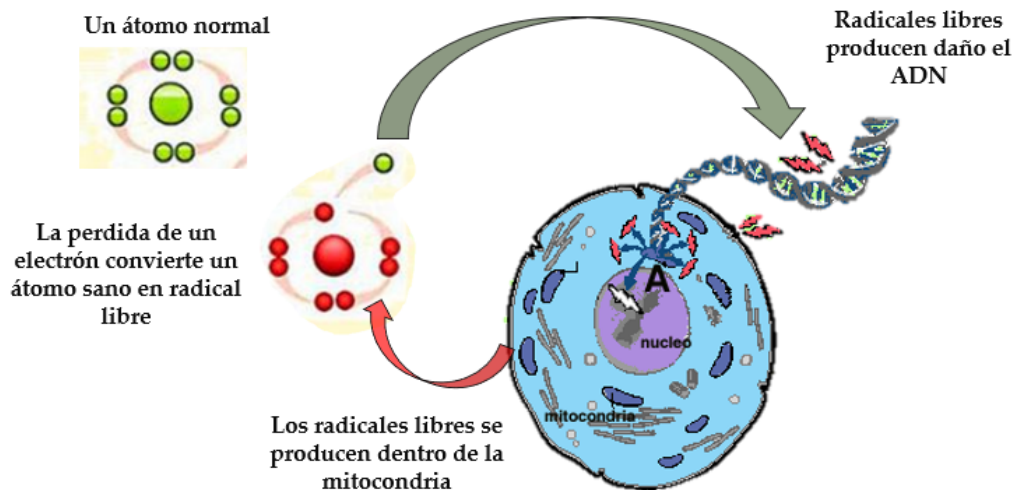


Figura 9. Radicales libres y el estrés oxidativo. Tomado y modificado Collins (1996).

2.10.1. Radicales libres

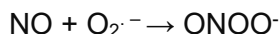
Los radicales libres (RL) son moléculas inestables, de bajo peso molecular y altamente reactivas, su inestabilidad es causada principalmente porque tienen uno o más electrones desapareados. Y como resultado de esta configuración, los RL toman electrones de otras moléculas, lo que la mayoría de las veces causan daño a la otra molécula y se comienza el proceso en cadena llamado estrés oxidativo (Maldonado, 2010). Los RL generalmente son moléculas de oxígeno, pero no siempre. De forma análoga existen ERN, especies reactivas de azufre (ERS) y especies reactivas de cloro (ERCI). Los RL están asociados con enfermedades humanas, incluyendo el cáncer, la arterioesclerosis, Alzheimer, la enfermedad de Parkinson entre otras. También tienen un vínculo con el envejecimiento que se ha definido como la acumulación gradual de daños por radicales libres (Venereo, 2002).

No obstante, lo expresado anteriormente, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la de participar en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, y la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis. Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son:

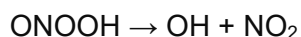
- Radical hidroxilo (HO)[•]
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)
- Anión superóxido (O₂^{•-})
- Oxígeno singlete (1O₂)
- Oxígeno nítrico (NO)
- Peróxido (ROO)
- Semiquinona (Q)
- Ozono

Asimismo, las especies reactivas de nitrógeno como el óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO⁻) y nitrito pueden ser citotóxicas y causar estrés nitrosativo (Sánchez, 2011).

Aunque el NO es un RL tiene una reactividad baja, sin embargo, es precursor de más ERN. A partir del NO y el anión superóxido se forma el peroxinitrito (ONOO⁻):



La formación de ONOO⁻ tiene la capacidad de modificar biomoléculas como aminoácidos y proteínas a través de procesos de oxidación y nitración proceso que consiste en la adición de un grupo nitro a una biomolécula. Y la protonación del radical peroxinitrito da origen al ácido peroxinitroso (ONOOH), el cual se puede descomponer en los radicales hidroxilo y dióxido de nitrógeno como se puede ver en la reacción siguiente:



El radical hidroxilo (OH) es capaz de oxidar proteínas y bases de ADN, mientras que el radical NO₂ tiene un alto poder nitrante y además es un potente agente lipoperoxidante (Cárdenas *et al.*, 2006).

2.11. Biomarcadores

La presencia de un toxico en el ambiente implica un riesgo, y para evaluar ese riesgo es necesario determinar la presencia de ese toxico en el organismo. La relación entre el nivel de toxicidad de un xenobiótico presente en un organismo y la respuesta toxica es algo compleja debido a que depende de varios factores como la toxicocinética y la genética del organismo. Una manera de poder medir el efecto a la exposición de un contaminante o varios sobre un sistema biológico es a través de la monitorización biológica de biomarcadores (Gil, 2000). Entonces, un biomarcador de toxicidad es una variable bioquímica, fisiológica o anatómica que detecta las alteraciones inducidas por la presencia de un xenobiótico sobre los componentes celulares o bioquímicos en un organismo. La exposición a sustancias tóxicas puede dar origen a alteraciones tempranas, previas al desarrollo de una enfermedad y que podrían estar correlacionadas con efectos a largo plazo. Estos cambios tempranos pueden ser evaluados en modelos experimentales o en individuos expuestos.

Los biomarcadores son útiles para determinar consecuencias biológicas de una exposición; detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico; identificar individuos sensibles en una población y fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental. Para la elección de un biomarcador se deben considerar los siguientes aspectos: la especificidad que se basa en la información que aporta ya sea sobre el agente al que se expone el organismo o el tipo de efecto que se manifiesta, por ejemplo, clastogénesis, aneugénesis, daño oxidativo, entre otros (Grandjean, 1995). Entre los biomarcadores más utilizados para evaluar toxicidad de contaminantes encontramos: expresión y actividad enzimática como glutatión-S-transferasa, acetilcolinesterasa, síntesis de metalotioneínas, de estrés oxidativo como peroxidación lipídica, actividad del citocromo P450, daño al ADN, aberraciones cromosómicas, citotoxicidad, entre otros (Arango, 2012).

Los biomarcadores de exposición ideales son los que tienen la ventaja de reaccionar rápidamente con factores tóxicos ambientales, y de esta manera a través de ellos se pueden evaluar los efectos de los contaminantes biológicamente disponibles (Toro, 2011). Además de lo anterior, un buen biomarcador debe ser de alta sensibilidad, especificidad, rápido, económico y que tenga suficiente relevancia clínica para establecer la toma de decisiones con respecto a los procesos patogénicos en los que se aplica (Torres & Pérez, 2016).

En general se aceptan dos tipos de biomarcadores, de exposición y de susceptibilidad. Un biomarcador de exposición indica la presencia de una sustancia exógena, o de algún metabolito producto de la interacción de un agente con una molécula o célula blanco (Rutstein *et al.*, 1997). Los biomarcadores de susceptibilidad manifiestan la existencia de factores individuales o poblacionales que pueden afectar la respuesta a la exposición a distintos agentes. Una condición intrínseca o una enfermedad pueden amplificar el daño sobre el tejido blanco.

Los biomarcadores de efecto utilizados en toxicología pueden ser evaluados a través de ensayos de corto y largo plazo a través de una batería de ensayos con modelos de diferentes niveles de complejidad: procariontes, eucariontes unicelulares, plantas superiores y animales invertebrados o vertebrados. Y permiten una determinación rápida de posibles efectos bioquímicos y/o mutagénicos.

Los biomarcadores en genética toxicológica son indicadores de daño genético a nivel de ADN, cromatina, así como a nivel de otros eventos relacionados con la división celular, entre ellos cabe mencionar: frecuencia de aberraciones cromosómicas, frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, frecuencia de micronúcleos, ruptura de simple y doble hebra por ensayo cometa (Preston, 1999). La inhibición en la actividad mitótica, los índices de fases y la cinética de proliferación celular están considerados marcadores de citotoxicidad (Ostrosky, 1993).

2.11.1. Biomarcadores de estrés oxidativo/nitrosativo

Los biomarcadores de estrés oxidativo/nitrosativo son enzimas específicas o productos de daño oxidativo (metabolitos) que pueden ser valorados e indican de forma objetiva respuestas a procesos fisiológicos y patológicos como resultado de la exposición a un contaminante o tratamiento farmacológico. En seguida se enumeran algunos de los biomarcadores más utilizados en la determinación del estrés oxidativo/nitrosativo:

2.11.1.1. Biomarcadores de peroxidación lipídica

➤ Malondialdehído

Este biomarcador es un cetoaldehído que se produce como resultado de la descomposición de lípidos insaturados producto del ataque de las especies reactivas de oxígeno (ERO's) a los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de los fosfolípidos de la membrana celular. La peroxidación lipídica se caracteriza por una reacción en cadena, de tal forma que cuando un lípido es alterado, este puede promover la peroxidación de los lípidos más cercanos (Rojas, 2010). Los ácidos grasos poliinsaturados, constituyentes de

los lípidos, son más susceptibles a per oxidarse, debido a que sus hidrógenos bis-alfílicos son fácilmente “extraíbles” comparados con los hidrógenos alifáticos, una vez iniciado este proceso prosigue como una reacción en cadena (figura 10), involucrando las etapas de propagación, ramificación y terminación (Giacopini, 2016).

La iniciación es el paso donde el radical de ácido graso es producido. Los iniciadores en células vivas más notables son ERO tales como el radical OH, el cual se combina con el hidrogeno para dar lugar a agua y a un ácido graso radical. Pero el ácido graso radical no es una molécula muy estable, de modo que reacciona rápidamente con oxígeno molecular, creando de este modo un ácido graso peroxil radical. El mismo también es una especie muy inestable por lo cual reacciona con otro ácido graso dando lugar a un ácido graso radical diferente y a un peróxido lípido o un peróxido cíclico si ha reaccionado consigo mismo. Este ciclo continúa ya que el nuevo ácido graso radical se comporta de la misma manera.

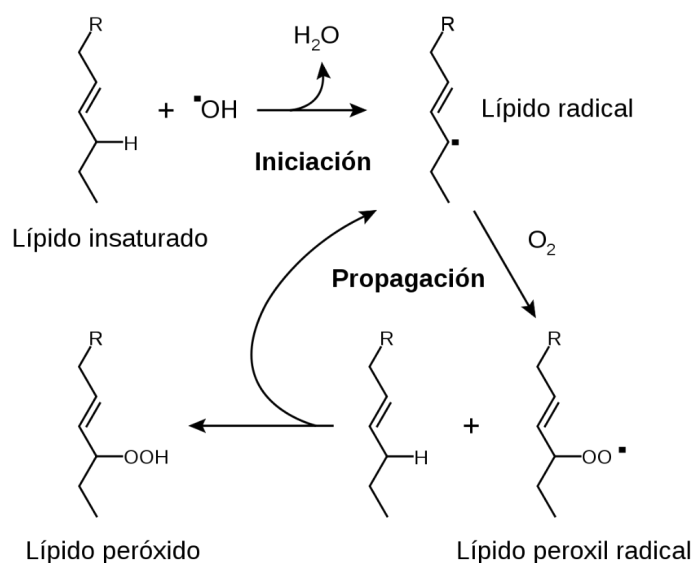


Figura 10. Representación esquemática de la peroxidación lipídica. Tomada de Kamiya Biomedical Company (2020).

Cuando un radical reacciona, siempre produce otro radical, es por ello por lo que se trata de un mecanismo de reacción en cadena. La reacción radical se detendrá cuando dos radicales reaccionan y producen una especie no radical. Esto ocurre solamente cuando la concentración de especies radicales es lo suficientemente alta como para que exista la probabilidad de que se encuentren dos radicales. Los organismos han evolucionado diferentes moléculas que aceleran el proceso de terminación atrapando radicales libres, protegiendo de esta manera la membrana celular. Uno de estos importantes antioxidantes es la vitamina E. Otros antioxidantes de importancia incluyen las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa (Ostrea *et al.*, 1985).

➤ **4-Hidroxi-2-nonenal (HNE)**

El HNE es un aldehído de gran toxicidad altamente reactivo que se produce debido al daño que causan las ERO y las ERN sobre los ácidos araquidónico, linoleico y linolénico. El incremento de HNE se debe principalmente a una condición patológica de peroxidación

lipídica. El HNE reacciona con fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos actuando como inductor de citotoxicidad, mutagénesis y toxicidad genética.

2.11.1.2. Mecanismos enzimáticos y no enzimáticos antioxidantes

➤ **Glutación (GSH)**

-El GSH es el mercaptano intracelular no proteico más abundante en los seres vivos, y en las células juega un papel de suma importancia como principal defensa intracelular contra el EO (Li, 2022). La vida media del GSH en el plasma es de segundos, y sus concentraciones en plasma son un indicador del GSH tisular por lo que su concentración se considera un parámetro que refleja el estrés oxidativo en un organismo (González, 2019).

➤ **Superóxido dismutasa (SOD)**

Una de las metaloenzimas antioxidantes que más ha sido estudiada como primera línea de defensa con las ERO es el SOD. Esta enzima es sumamente efectiva contra el radical superóxido. Se conocen tres isoformas cada una con un cofactor específico: SOD1 (Cu/Zn-SOD), se localiza en el citoplasma; SOD2 (Mn-SOD), localizada en la matriz mitocondrial; SOD3 (Cu/Zn-SOD), análoga a SOD1, pero esta se localiza en el espacio extracelular. La enzima MnSOD es el eliminador endógeno más eficiente que puede apagar las ERO mitocondriales y proteger contra el EO (Hsiang *et al.*, 2021).

➤ **Catalasa (CAT)**

La CAT es una enzima que complementa la acción protectora de la SOD catabolizando peróxido de hidrogeno en oxígeno sin generar RL (González, 2019). Son tres los grupos de CAT que llevan a cabo la reacción biológica. Dos son hemo dependientes y la tercera depende del manganeso. Los grupos dependientes de hemo y Mn son sumamente distintos estructuralmente con la configuración de sus sitios activos diferentes totalmente. Las CAT de hemo contienen porfirina de hierro mononuclear en su sitio activo, y son CAT mono funcionales o CAT peroxidasas bifuncionales. Las CAT de Mn poseen un complejo de Mn binuclear, en lugar de hierro en su sitio activo (Abeera *et al.*, 2022). Los niveles de CAT varían en relación con el órgano, siendo más elevados en tejido hepático, moderadamente elevados en tejido renal y bajos en tejido cardiaco (González, 2019).

➤ **Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y nitratos**

La enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS) es una enzima que cataliza la conversión del aminoácido L-arginina a L-citrulina produciendo óxido nítrico (NO) a partir del átomo terminal de nitrógeno del grupo guanidino de la arginina (figura 11).

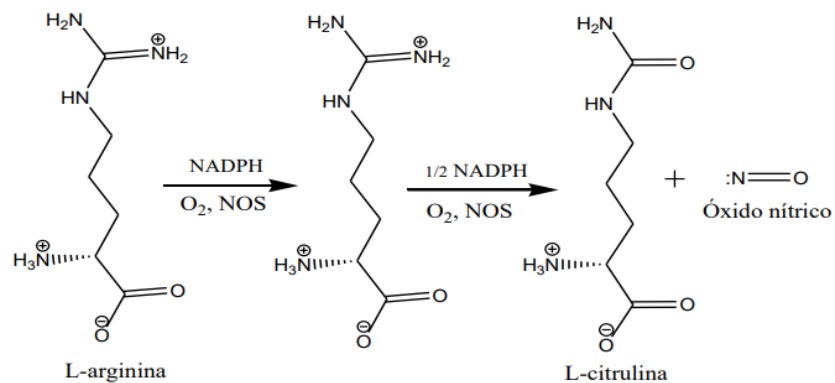


Figura 11. Catalización del óxido nítrico por la enzima NOS. Tomado de Martínez (2013).

El NO es la molécula principal del proceso de estrés nitrosante, es un gas incoloro, considerado un RL producido por células endoteliales, gliales y neuronas. Tiene una vida media de apenas 10 segundos ya que se oxida fácilmente formando nitrito y nitrato. El NO reacciona con el anión superóxido para formar peroxinitrito (ONOO⁻) que tiene un mayor poder prooxidante. El exceso de NO y otras ERN pueden oxidar membranas y nitrar proteínas lo cual altera su estructura y funcionalidad (Cárdenas *et al.*, 2006; González, 2019; Pulido, 2019). Debido a la corta vida del NO• es complicado cuantificarlo por eso se cuantifican sus metabolitos estables como el nitrato NO₂⁻ (Adarmes *et al.*, 2009).

2.12. Metalotioneína (MT) como biomarcador

Las metalotioneínas constituyen una superfamilia de proteínas de bajo peso molecular (de 6000 a 10000 Da). Se encuentran en el citoplasma, en el aparato de Golgi de las células, pero también han sido identificadas en el núcleo, son ricas en cisteína capaces de unir metales a su estructura, tanto fisiológicos (zinc y cobre) como xenobióticos (como cadmio, mercurio y plata), a través de los grupos tiol (-SH) de sus residuos de cisteína, que representan casi el 30% de aminoácidos. (Juárez & Méndez, 2014).

Estas metaloproteínas han sido propuestas como biomarcadores frente a la presencia de iones metálicos, debido a que sus niveles pueden aumentar sustancialmente en el organismo tras su exposición a metales tóxicos. Además de ser inducibles por los MP las MT participan activamente almacenando el exceso de grupos tiol con el propósito de prevenir el estrés inducido por los radicales libres (Siddiqui *et al.*, 2019). Aunque las (MT) se expresan en todos los tejidos, abundan en mayor proporción en tejidos parenquimales como hígado, riñón y páncreas. Su nivel de expresión va a estar dado por factores como, edad, dieta y factores ambientales. De manera que la cuantificación de esta proteína se ha convertido en un importante biomarcador de contaminación ambiental, particularmente para evaluar la presencia y concentración de metales pesados (Tapia, 2002).

Hay cuatro clases de MT (MT1, MT2, MT3 y MT4) y están codificadas por un conjunto de genes cromosómicos (16q13). Las isoformas más prominentes en las células humanas son MT1 y MT2 (Di Liu, 2017). Se cree que las MT median diversas funciones, que incluyen la regulación de concentraciones críticas de elementos traza (por ejemplo, zinc, cobre) y la protección celular contra el estrés oxidativo. El aumento de la expresión de MT se ha

relacionado con muchas enfermedades inflamatorias, diabetes, y cáncer. La matalotioneína MT2A es la isoforma de células mamarias más comúnmente conocida. El desarrollo del ARNm de MT2A está directamente relacionado con la etapa histológica. Basado en la asociación de la expresión MT y las patologías clínicas del cáncer de seno identificadas en muchos estudios, la matalotioneína es un biomarcador pronóstico en el cáncer de seno (Kamala *et al.*, 2020).

CAPITULO III. METODOLOGÍA

El enfoque de esta investigación es de tipo mixto. Por esta razón se llevó a cabo un trabajo experimental y documental. Ya que el objetivo fue determinar el valor de la contaminación en el río Atoyac tomando en cuenta los diversos elementos tanto cuantitativos como cualitativos que han influido en la degradación del agua del río en dos de las localidades de mayor desarrollo urbano e industrial de la zona del Alto Atoyac. Se realizó una investigación transaccional y correlacional recolectando muestras y analizándolas en un momento y tiempo únicos; y se determinó la relación de resultados cuantitativos con las variables cualitativas que intervienen en el fenómeno de la contaminación del río Atoyac en la zona a través de la construcción de las dimensiones que permiten comprender la diversidad y la complejidad de los fenómenos que influyen en la problemática de la contaminación del río Atoyac.

El trabajo se dividió en tres fases (figura 12): la primera consistió en un trabajo de gabinete para delimitar y caracterizar la zona de estudio para lo cual se recopiló, ordenó y analizó información de las páginas oficiales de organismos públicos como: el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI, 2020), el Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED, 2010), el Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (CONEVAL, 2020) y el Consejo Nacional de Población (CONAPO, 2015). También fueron consultadas las plataformas de Interfaz de Programación de Aplicaciones (API) como el Directorio Nacional de Unidades Económicas (DENUE, 2020), Google Maps, Google Earth y el Sistema Nacional de Información Municipal (SNIM), sistemas de consulta en línea que proporcionan información sociodemográfica de municipios y alcaldías de todos los estados del país.

Con la información recopilada se determinó la distribución industrial, la densidad poblacional, la densidad industrial y la caracterización de los principales contaminantes emitidos en la zona de estudio.

La segunda etapa consistió en una investigación de campo para observar de manera directa el tipo de actividades antropogénicas y su distribución en la zona de estudio, para lo cual

se hicieron recorridos a lo largo del río Atoyac (10.3 km) iniciando en la localidad de San Cristóbal Tepatlaxco (SCT) ubicado a 1.5 km del centro de San Martín Texmelucan Labastida (SMTL) y finalizando en las localidades de Villa Alta (VA) y San Mateo Ayecac (SMA) pertenecientes al municipio de Tepetitla de Lardizábal (TL), Tlaxcala. Se llevaron a cabo las tomas de muestra de agua en las zonas de muestreo y su análisis *in situ* fisicoquímico.

La tercera etapa consistió en trabajo de laboratorio, se analizó la calidad fisicoquímica del agua del río en las zonas de muestreo, y se evaluó sus efectos bioquímicos y citotóxicos en los biomodelos *Danio rerio* y *Allium cepa*.

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

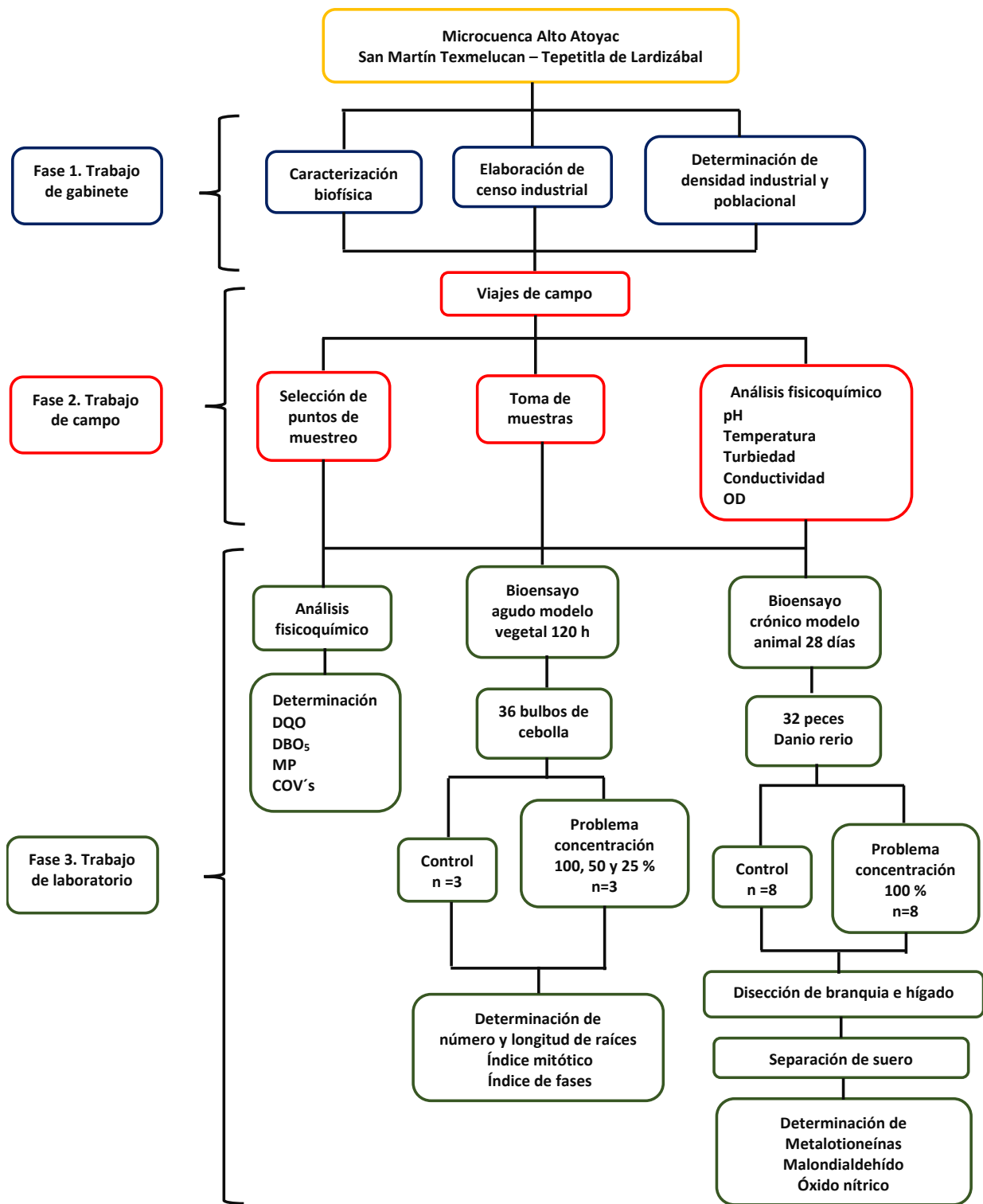


Figura 12. Diagrama de trabajo de la tesis de investigación

3.2. Descripción de la zona de estudio

3.2.1. Descripción del medio físico de la zona de estudio.

Los municipios de San Martín Texmelucan (SMT) y Tepetitla de Lardizábal (TL) se localizan en la zona nororiental del Altiplano Central Mexicano en las coordenadas 19°17'07" N - 98°26'01" O y 19°0'0" - N 98°0'0" O. Cuentan con una extensión territorial de 71.45 km² y de 28.68 km² respectivamente, su altitud fluctúa entre los 2 260 y 2 265 msnm (figura 12). La zona colinda al norte con los municipios de San Matías Tlalancaleca y Municipio de Ixtacuixtla de Mariano Matamoros, al sur con Huejotzingo, al oriente con el municipio de Nativitas, al poniente con el Municipio de San Salvador el Verde (INAFED, 2010). El clima predominante en ambos municipios es templado subhúmedo con lluvias en verano, la temperatura media anual oscila entre los 12 y 18 °C; y la precipitación promedio anual es de 800 a 1,000 mm (Plan Municipal de Desarrollo Tepetitla de Lardizábal y San Martín Texmelucan).

3.2.2. Relieve.

El relieve en la zona de SMT es en general plano, con un ligero y continuo ascenso en dirección este-oeste, con dirección a la Sierra Nevada; su altura promedio es de 2,280 msnm, y presenta algunas protuberancias; al noroeste el Cerro Totolqueme con una altura de 2,560 msnm, actualmente casi deforestado cuyos suelos se utilizan para siembra de maíz de bajo rendimiento; al sur, los cerros de Tepeyecac, con una altura de 2,380 msnm, al oriente una pequeña loma compartida con el pueblo de San Mateo Ayecac del Estado de Tlaxcala, su conexión es al poniente y sus terrenos son para cultivos de temporal y por último el Cerro Mendocinas al noreste y suroeste con una altura de 2,520 msnm, que tiene dos crestas conservando bosque en la primera parte y en la segunda uso de suelo para casas habitación. La orografía del municipio de TE presenta tres formas características que son: zonas planas, que comprenden el 75 % de la superficie total del municipio; zonas semiplanas las cuales ocupan el 20 % por ciento de la superficie, ubicándose en la parte norte y zonas accidentadas que abarcan el 5 % restante, y que se localizan al suroeste del municipio (INAFED, 2010).

3.2.3. Características biofísicas

3.2.3.1. Hidrología.

Ambos municipios pertenecen a la cuenca del río Atoyac que a su vez es la primera sección del Alto Balsas (Región hidrológica RH18); y es la más importante en el estado de Puebla (CONAGUA. 2010). El río Atoyac nace de los deshielos del volcán Iztaccíhuatl y representa la corriente hídrica de mayor longitud en el estado de Puebla. Con un recorrido cercano a 200 km cubre un área aproximada de 4130 km² y residen en ella aproximadamente de 3.3 millones de habitantes (Martínez *et al.*, 2017). Al descender la corriente atraviesa las localidades de San Lucas el Grande y San Martín Texmelucan Labastida en el estado de Puebla recorriendo aproximadamente 30 km antes de su ingreso al estado de Tlaxcala a la altura de la localidad de Tepetitla de Lardizábal donde recorre 29 km y vuelve a ingresar totalmente a Puebla del lado suroeste para recorrer otros 35 km antes de llegar a la presa Manuel Ávila Camacho (Pérez *et al.*, 2018; Rodríguez *et al.*, 2014, Ayuntamiento Constitucional del Municipio de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala. 2015.).

3.2.3.2. Vegetación

La vegetación dominante en la zona de estudio está representada por la agricultura (72.62 %), de hecho, se considera la zona de riego agrícola más extensa del Valle de Puebla-Tlaxcala (Hernández, 2017). El pastizal inducido representa apenas el 1.51 %. Debido al gran crecimiento urbano prácticamente los municipios no presentan vegetación silvestre, la cual es de tipo secundario asociada a los terrenos de cultivo donde se pueden observar arboles de sauce (*Salix bonplandiana*), tejocote (*Crataegus pubescens*), capulín (*Prunus serotina*), tepozán (*Buddleia cordata*) y pirul (*Schinus molle*). El único vestigio de vegetación silvestre está representado por la vegetación de galería ubicada en las riberas del río Atoyac y algunos vestigios de bosque caduco, constituida fundamentalmente por pinos, encinos, fresnos y sauces (INAFED, 2010).

3.2.4. Características sociales

El municipio de SMT cuenta con una población total de 155 738 habitantes (Tabla 1) y grado de desarrollo social es de nivel bajo (INEGI, 2020). El 55 % de la población vive en pobreza moderada. En SMT hay un total de 36 105 viviendas de las cuales el 1.9 % no tiene acceso al agua, 3.1 % no tiene drenaje y 0.4 % no cuentan con energía eléctrica (INEGI, 2020, CONAPO, 2015).

Las principales carencias sociales son: rezago educativo 14.4 %, acceso a la salud 25.2 %, sin acceso a seguridad social 30.3 % y sólo el 5.8 % cuenta con todos los servicios básicos de vivienda (CONEVAL, 2020). TL tiene una población de 23 019 habitantes con un grado de desarrollo social bajo. El 49.9 % de sus habitantes viven en pobreza moderada. Hay un total de 5077 viviendas de las cuales el 1.3 % no tienen acceso al agua potable, 3.3 % no cuentan con drenaje y apenas el 0.6 % carecen de electricidad (CONEVAL, 2020). Como principales carencias sociales tiene un rezago educativo del 13.2 %, un acceso a la salud del 20.4 %, el 31.2 % de la población no tiene acceso a la seguridad social y el 9 % de las viviendas cuenta con todos los servicios básicos (CONAPO, 2015; INEGI, 2020).

3.2.5. Actividad económica

SMT es un municipio que gracias a su ubicación geográfica y condiciones naturales lo han hecho un lugar propicio para el desarrollo industrial y comercial. Las principales actividades económicas de SMT son: el comercio 56.5 %, seguido de las actividades industriales 31.8 % y por último las actividades agrícolas 11.1 % (Tomé *et al.*, 2017). La mayor parte de la población económicamente activa del municipio se concentra en la cabecera municipal con el 61.65 %; seguida de Santa María Moyotzingo con el 17.77 %.

En todo el municipio hay establecidos 1452 comercios, de los cuales los más importantes son el Mercado Municipal Domingo Arenas, Centro Comercial Plaza Cristal y el Tianguis de San Lucas Atoyatenco considerado uno de los más grandes de Latinoamérica (INEGI, 2010). Respecto al sector industrial, SMT es una zona estratégica tanto para la capital de Puebla como para el estado de Tlaxcala (Tomé *et al.*, 2017). En SMT se encuentra ubicado el corredor industrial Quetzalcóatl. En este corredor hay empresas del sector de autopartes, construcción, química, de alimentos, fabricación de bebidas, papelera y textil.

Dentro de las empresas más reconocidas en el lugar están: el Complejo Petroquímico Independencia, Rassini Frenos, DUPONT, Global Denim, pinturas y papelera Kimberly Clark entre otras. Pero sin lugar a duda la industria más importante ubicada en San Martín es la industria química y petroquímica (PEMEX), esta industria paraestatal brinda muchos empleos en el municipio (Gutiérrez & García, 2010). SMT y sus juntas auxiliares se dedican principalmente a la producción de trigo, alfalfa, maíz y chile. También se cosecha frijol, calabaza, cebolla, coliflor, lechuga, rábano, cilantro, betabel, cilantro y perejil. Sin embargo, el sector agrícola ha perdido un poco de fuerza en los últimos años, y los niveles de producción no son tan altos como en los años anteriores, debido a la urbanización. La creación de carreteras y establecimientos comerciales tienen mucho que ver en esto; pero también, el cambio constante del clima y las plagas han provocado la pérdida de miles de hectáreas de cultivo (INEGI, 2019).

TL en los últimos 30 años ha experimentado una profunda transformación en su estructura económica. De ser una comunidad agrícola, ha pasado a ser preponderantemente manufacturera y, a la fecha, su población vive prácticamente de la realización de actividades industriales y comerciales, acorde con los cambios que se han presentado en el corredor industrial Puebla-Tlaxcala que agrupa empresas de índole alimentario, automotriz, textil, petroquímico, de minerales no metálicos, químico y de confección (Plan Municipal de Desarrollo 2010-2014).

El sector secundario aporta el 48.23 % de la producción bruta total municipal, el sector terciario el 36.05 % y el sector primario aporta apenas el 14.76 % (Periódico Oficial Tepetitla 2016). En la zona de estudio, el proceso de industrialización se agudizó con el establecimiento del corredor industrial Ixtacuixtla donde se ubican 13 empresas de los giros alimenticio, bebidas, petroquímico, textil, farmacéutico y autopartes. No obstante, la industria textil es la de mayor presencia en el municipio, no solo de grandes empresas dedicadas a la tapicería de automotriz y a la fabricación de mezclilla. Sino también debido a la existencia de talleres de mezclilla informales, principalmente en las localidades de San Mateo Ayecac y Tepetitla, localidades del municipio de TL (Vallejo, 2016).

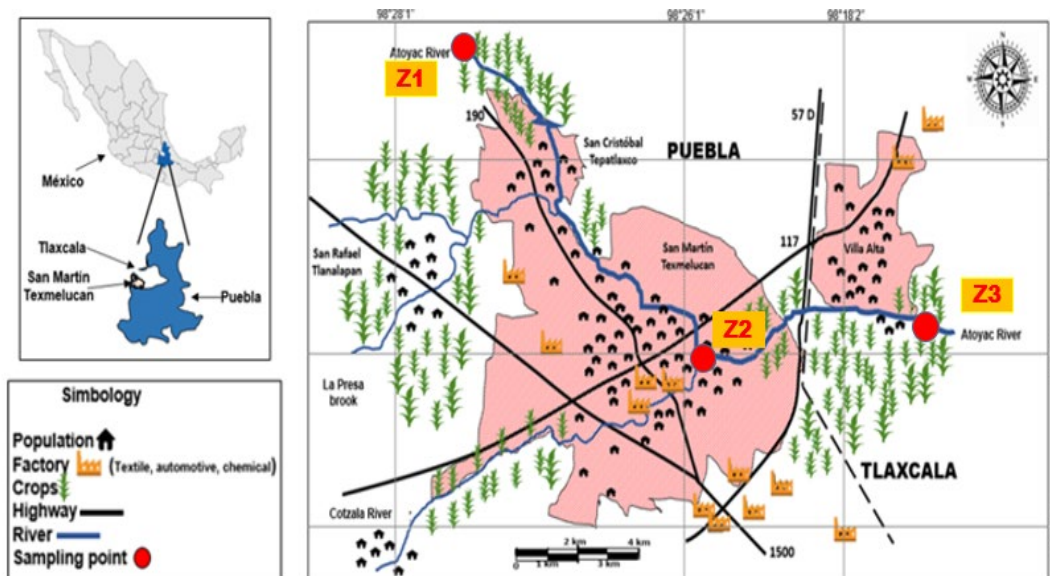


Figura 13. Mapa de las zonas de estudio en el Río Atoyac. INEGI, 2010. Elaboración propia

3.3. Distribución industrial

La ubicación de industrias en la zona de estudio se llevó a cabo consultando la base de datos del DENUE, 2020; posteriormente las industrias ubicadas se identificaron por giro de acuerdo con la clasificación de actividades económicas del sector secundario del INEGI (Anexo 1). Una vez identificadas se hizo la clasificación de las unidades industriales con mayor impacto en el agua del río Atoyac a través del método de evaluación rápida de fuentes contaminantes ERFCA, a través de las tablas que indican a las industrias con mayor impacto negativo en el agua de acuerdo con su parámetro de carga contaminante en Kg/m^3 de descarga (Anexo 2).

Las industriales seleccionadas fueron señaladas para cada zona de estudio sobre el mapa interactivo del DENUE con tachuelas en color amarillo las altamente contaminantes y en rojo las industriales consideradas poco contaminantes (Anexo 3). Entre las industrias clasificadas como altamente contaminantes de acuerdo con los criterios de las tablas de ERFCA se encuentran grandes, medianas y pequeñas empresas de los giros textil, químico, metalmeccánico, alimenticio y papelerero. Adicionalmente fueron consideradas microempresas como herrerías, talleres textiles e imprentas, ya que, son fuentes de diversas sustancias como metales, tintas, solventes, colorantes, ácidos y bases entre otros. Fueron excluidas las industrias no contempladas en las tablas de ERFCA, ya que debido a su carga contaminante no son consideradas como altamente contaminantes como son panaderías, tortillerías, purificadoras de agua, paletterías y restaurantes. Por último, se determinó el número de unidades industriales y su clasificación por tipo de actividad manufacturera en cada una de las localidades de las zonas de estudio para determinar su distribución por giro en cada una de ellas (Tabla 2).

3.3.1. Determinación de densidad industrial (DI) y poblacional (DP).

La densidad industrial y poblacional son factores clave que influyen en la capacidad de los ecosistemas para proporcionar servicios a los seres humanos (Qian *et al.*, 2021).

Estos parámetros muestran la relación que existe entre el número de industrias y de habitantes por km² en una localidad. Cuanto mayor es la actividad económica y poblacional en un territorio, mayor será la probabilidad de incremento de la emisión de agentes contaminantes al ambiente.

Para la determinación de la DI y DP fue necesario obtener primero el número de unidades empresariales y el número de habitantes establecidos en cada una de las localidades ubicadas en la zona de estudio, también se obtuvo la superficie territorial de dichas localidades, para lo cual se consultó la base de datos del DENU (2020) e INEGI (2020). Con los datos mencionados la DI y la DP fueron calculadas aplicando las fórmulas de las ecuaciones:

$$DI = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de industrias en la localidad} \times 100}{\text{Superficie de la localidad en km}^2} \quad (1)$$

$$DP = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de habitantes en la localidad} \times 100}{\text{Superficie de la localidad en km}^2} \quad (2)$$

3.4. Selección de sitios de muestreo y toma de muestras.

Fueron elegidos tres puntos de muestreo a lo largo del cauce principal del río Atoyac. El primero en la localidad de la zona agroforestal de San Cristóbal Tepatlaxco (SCT) (Z1), el segundo en la zona urbana de San Martín Texmelucan Labastida (SMTL) (Z2) en el estado de Puebla y el tercero en la localidad rural e industrial de Villa Alta y San Mateo Ayecac (SMA), en el estado de Tlaxcala (Z3) (Tabla 1). Posteriormente, en cada punto elegido se colectaron muestras de agua en la temporada de lluvias (agosto-septiembre de 2019) tomando como base los lineamientos establecidos en la NOM 014-SSA1-1993 la cual dicta los procedimientos para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados.

El muestreo fue superficial (dentro de 15 a 30 cm de la superficie del agua) para la cual se sumergió como contenedor una cubeta en el centro del río, cuidando evitar contaminación de la muestra por disturbio del fondo o del lecho. Una vez tomada la muestra una parte se utilizó para llevar a cabo un diagnóstico *in situ* determinando algunos parámetros fisicoquímicos básicos (figura 12). Otra parte de las muestras fueron almacenadas en recipientes de polietileno con capacidad de 2 L y bidones de polietileno de 20 L con tapa de poli tetrafluoretileno, los cuales fueron etiquetados previamente para su identificación; finalmente las muestras fueron trasladadas al laboratorio para su análisis y complementar el diagnóstico de la calidad del agua, así como para efectuar los bioensayos con los biomodelos *Danio rerio* y *Allium cepa*.

Tabla 1. Criterios de selección zonas de estudio

Zona	Localidad	Coordenadas	*No. Hab.	**No. Fab.	Características de zonas de estudio
1	San Cristóbal Tepatlaxco	19°17'54.6" N 98°27'23.0" W	10200	45	Zona rural: área forestal, campos de cultivo (maíz y trigo), actividades agropecuarias (ganado vacuno), elaboración de productos lácteos.
2	San Martín Texmelucan Labastida	19°16'59.1" N 98°25'31.4" W	68064	332	Zona urbana: alta densidad poblacional (64 colonias), actividad industrial (42 empresas medianas y mayores; y talleres informales textiles), intensa actividad comercial (tianguis de ropa más grande de A. L.), confluye el Río Cotzala (agua residual textil, agricultura (glifosato)).
3	Villa Alta/San Mateo Ayecac	19°17'85.8"N 98°18'1.6" W	12157	71	Zona rural: producción agrícola (hortalizas, granos) actividad industrial (parques industriales (Quetzalcóatl e Ixtacuixtla) y decenas de talleres informales textiles)).
Total			90421	448	

*Hab. = Población; **Fab. = Fabricas.

3.5. Análisis de parámetros

3.5.1 Determinación de propiedades fisicoquímicas *in situ*.

En cada zona de muestreo se determinó por triplicado temperatura, pH, Ce y OD (figura 13). La temperatura del agua superficial se cuantificó según lo que establece la Norma NMX-AA-007-SCFI-2013, con un termómetro de vidrio con columna de mercurio escala de -10°C a 110°C marca Celsius. La medición de pH se efectuó según los lineamientos de la Norma NMX-AA-008-SCFI-2016 utilizando un pH metro pHep® modelo HI 98107 previamente calibrado a 2 puntos con buffers de calibración HI 770710P, pH 7.01 y 10.01. El oxígeno disuelto se calculó mediante el método Winkler, con un Kit de Oxígeno Disuelto HANNA® HI 3810. Para la medición de conductividad eléctrica (CE) se utilizó un medidor portátil de marca CONDUCTRONIC modelo PC18. Se calibró el electrodo del aparato con solución estándar de cloruro de potasio 0.01 M en un rango de 1 a 1999 µS.



Figura 14. Toma de muestras de agua en las zonas de estudio y lectura de parámetros en campo.

3.5.2. Determinación de propiedades fisicoquímicas en laboratorio.

La caracterización del agua del río, en las zonas de muestreo, se complementó determinando los siguientes parámetros fisicoquímicos: demanda química de oxígeno (DQO), demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅), turbidez (TURB), compuestos orgánicos volátiles (COV's) y metales pesados (MP).

Para medir la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) se utilizó un incubador OxiTop control OC 100, el cual contiene 12 botellas ámbar de 500 mL provistas de un sistema de medición manométrica de presión, en cada una de las tapas. El método consiste en la medición de los cambios de presión parcial del oxígeno como consecuencia del consumo en la oxidación biológica de la materia orgánica, añadiendo previamente (inicio de incubación) un inhibidor del proceso de nitrificación, y absorbiendo del sistema, el CO₂ producido mediante pastillas de KOH.

El tiempo de incubación fue de 5 días a una temperatura de 20 °C. Se colocaron 250 mL de muestra en cada botella de incubación. Luego de añadir las muestras de agua en las respectivas botellas incubadoras, se colocó en cada una de ellas, un agitador magnético, el KOH y una gota del inhibidor de la nitrificación. Finalmente, se colocaron las “tapas-sensores”, para iniciar el ciclo de medición. Se monitorearon los registros de las mediciones diariamente hasta el día 5.

El parámetro de DQO se determinó con un kit Spectroquant de rango 25-1500 mg/L. La prueba se basa en el método de la determinación del cromo III y la oxidación del ácido cromo sulfúrico, y contiene una serie de tubos o celdas de reacción, en las cuales se colocaron 3 mL de muestra. Una vez que la muestra se añade cuidadosamente por las paredes del tubo, se debe tapar y agitar vigorosamente. Luego de realizarse este procedimiento con cada muestra, estas se colocaron en un termo reactor a 148°C por 2 horas para posteriormente dejarse enfriar en la gradilla del kit por 10 min. Finalmente, las mediciones se realizaron en un fotómetro Nova 60 Spectroquant Merck, en el cual se introduce el tubo directamente, seleccionando el número de método 138.

La medición de la turbidez también se llevó a cabo con el fotómetro Nova 60 Spectroquant. El método es muy simple, y solo consiste en trasvasar un volumen de aproximadamente 10 ml de la muestra, sin ningún tipo de tratamiento ni filtrado, a una celda de medición rectangular de 50 mm de espesor, para luego colocarla en el fotómetro seleccionando el número 177.

La determinación de los COV's se efectuó bajo los lineamientos de la NMX-AA-103-SCFI-2006, para la determinación de compuestos orgánicos volátiles por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, para lo cual se utilizó un cromatógrafo de gases con puerto de inyección capilar y detector selectivo de masas. Se tomaron 5 ml de muestra y colocaron en un vial de cristal de gado A. El vial se colocó en el sistema de inyección el cual tomó una muestra de 10 µL que son vaporizados y transportados por una fase móvil de gas helio de grado 5 de pureza a una columna cromatográfica (5% fenil metil silicón) de 30 m de longitud por 0,32 mm de diámetro interno y 0,17 µm de espesor de película donde los componentes de la muestra se van separando por peso molecular y son identificados

por su relación masa-carga en el espectrómetro de masas. Finalmente, los detectores los cuantifican.

La medición de MP se realizó de acuerdo con la NMX-AA-051-SCFI-2016 que dicta los procedimientos para la determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas utilizando el método de espectrofotometría de absorción atómica (EAA). Se utilizó un EAA de atomización por flama con haz doble, monocromador, fuente luminosa y detector fotomultiplicador ajustable a los intervalos de longitud de onda de los analitos a cuantificar. Primero las muestras fueron homogeneizadas y filtradas través de una membrana de poro de 0,45 μm , de éstas se tomó una alícuota de 50mL que se acidificó a un $\text{pH} \leq 2$ con ácido nítrico concentrado y se procedió a analizar directamente en un EAA, para lo cual la muestra fue aspirada y atomizada por el equipo en una llama, el haz de luz proveniente de una lámpara atraviesa la llama y se dirige a un monocromador y un detector cuantificó la cantidad de luz adsorbida por la llama, la cual es la medida de la concentración del metal en la muestra. Cada metal tiene una longitud de onda característica.

3.6. Acondicionamiento de biomodelos: *Danio rerio* y *Allium cepa*

3.6.1. Pez cebra (*Danio rerio*) en condiciones de adaptación.

Los peces que se utilizaron en los bioensayos fueron criados en una granja piscícola en Cuautla, Morelos. El periodo en que los peces se adaptaron fisiológicamente de su medio ambiente a los cambios en las condiciones de laboratorio fue de 3 meses. Los peces fueron colocados en acuarios de 30 L con agua potable marca ESU (BUAP). Su peso corporal promedio fue de 0.8 ± 0.2 g, la temperatura del agua se mantuvo constante a $27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ mediante la ayuda de un termostato, el pH se mantuvo entre 7.3 - 7.5, las condiciones de iluminación fueron de 14:10 horas (luz/obscuridad), la concentración del oxígeno fue de 3.5 a 4 mg/L y los peces fueron alimentados con hojuelas comerciales Wardley dos veces al día (figura 15).

3.6.2. Bioensayos de toxicidad en pez cebra

Los bioensayos se llevaron a cabo tomando como base los protocolos modificados de la guía 203 de la OCDE para pruebas de toxicidad con peces de agua dulce (Anexo 4).

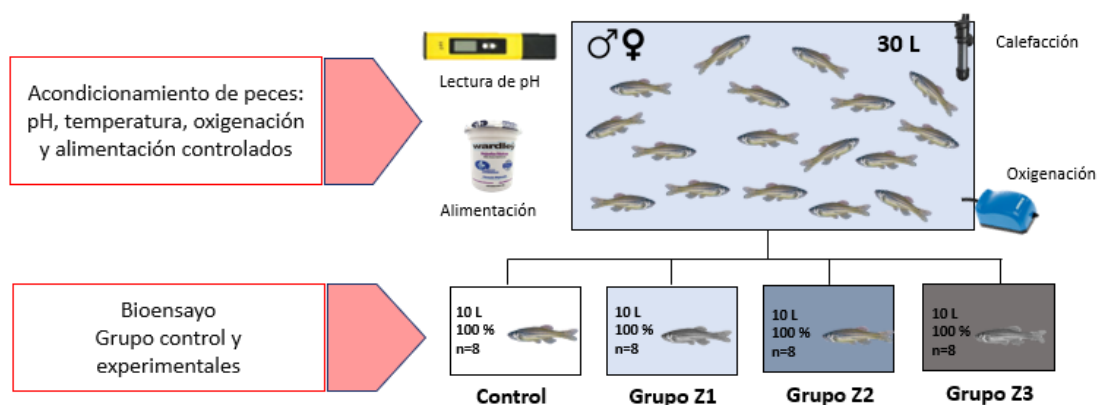


Figura 15. Bioensayo crónico utilizando el biomodelo *Danio rerio*.

Se formaron un grupo control con agua purificada de garrafón y tres grupos experimentales con agua de los tres puntos de muestreo al 100 % de concentración; cada grupo contó con una n=8 peces. Cada acuario contenía un volumen final de 10 L de acuerdo con la guía 203 que indica que la carga máxima debe ser de 1,0 g de pescado/litro de solución. El tiempo de exposición fue de 28 días (ensayo crónico) con cambio de agua cada siete días (Figura 15).

3.6.3. Obtención de muestras.

Una vez concluido el periodo de exposición los peces fueron eutanizados, colocándolos en agua helada a una temperatura $\leq 4^{\circ}\text{C}$, esto con el propósito de reducir los procesos metabólicos y locomotores, facilitando así su manipulación, posteriormente se les añadió gotas del anestésico benzocaína para reducir los niveles de estrés antes de la muerte.

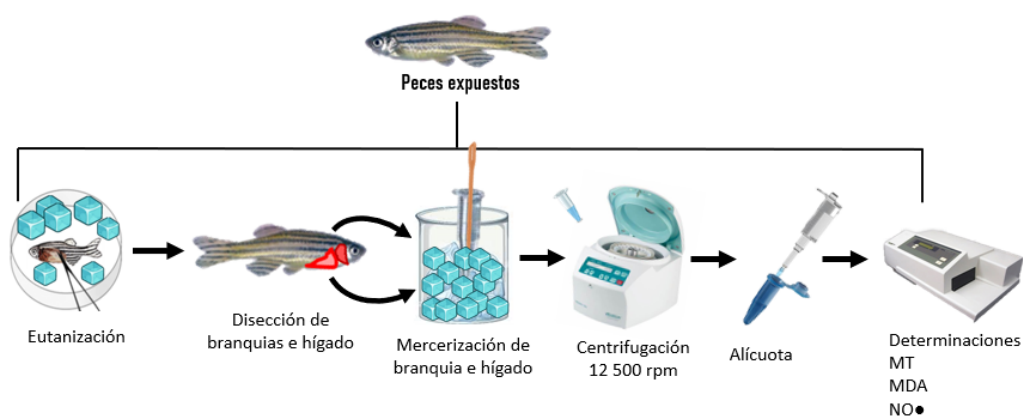


Figura 16. Disección y maceración de órganos para obtención de proteínas para determinación bioquímica.

Se diseccionaron las branquias e hígado para ser posteriormente homogenizados. Para la homogenización se coloraron los tejidos de branquia e hígado en tubos eppendorf sobre hielo para evitar la degradación de proteínas, se agregó solución fisiológica PBS 1X y con ayuda de un vástago de plástico se disgregó el tejido (figura 15).

El material disgregado se centrifugo durante una hora a 12 500 rpm. El sobrenadante se conservó a -70°C . Por último, de cada tubo se extrajo $1\mu\text{g}$ del sobrenadante para llevar a cabo la determinación de biomarcadores de exposición a metales pesados (MT) y de estrés oxidativo/nitrosativo (MDA y NO^{\bullet} respectivamente).

3.6.4 Determinaciones bioquímicas

Con el sobrenadante obtenido se llevaron a cabo las determinaciones de los parámetros bioquímicos: metalotioneínas, malondialdehído y nitritos.

3.6.5. Métodos y fundamentos

3.6.5.1. Cuantificación de metalotioneínas.

La determinación de metalotioneínas (MT's) se realizó de acuerdo con el método de saturación con ^{109}Cd /hemoglobina. Se homogenizaron los tejidos en frío con solución amortiguadora Tris-HCl 10 mmol/L, pH 7.4, posteriormente se procedió a homogeneizarlos con un rotor marca Labnet H5500. Después del homogeneizado se centrifugaron durante 30 minutos a 13400 rpm y a una temperatura de 4°C para evitar la desnaturalización proteica. El líquido sobrenadante se recuperó y mediante el método de Bradford se llevaron a cabo las cuantificaciones de las proteínas.

A 100 μL de sobrenadante se le adicionó 100 μL de ^{109}Cd . Posteriormente se incubó durante 10 minutos. Luego se adicionó 500 μL de una solución de hemolizado. Los tubos posteriormente se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 2 minutos y después fueron enfriados en un baño con hielo por 5 minutos. Finalmente fueron centrifugados a 18 000 rpm durante 5 minutos. Se adiciono el hemolizado a la muestra y se volvió a calentar en agua hirviendo, este paso se repitió una vez más y luego se determinó la concentración de cadmio en el sobrenadante a través de espectroscopia de absorción atómica de llama. La cantidad de ^{109}Cd fijado en las MT's presentes en el sobrenadante se midió con un detector de centelleo gamma (Pekín Elmer Wisard 170 Automatic Gamma Counter).

3.6.5.2. Cuantificación de Malondialdehído.

Los niveles de MDA fueron cuantificados por el método de Esterbauer y Zollner (1989). A 200 μL de la muestra se adicionaron 650 μL de la solución de 1-metil-2-fenil-indol a una concentración de 10.3 mM en acetonitrilo y metanol y 150 μL de ácido metanosulfónico. Las muestras se agitaron y se incubaron por una hora a 45° en baño María, posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos, se procedió a lectura del sobrenadante en un espectrofotómetro a 586 nm. La concentración de MDA fue determinada interpolando la densidad óptica de las muestras en la curva estándar patrón de MDA, 1,1,3,3-tetrametoxipropano (0.5 a 5 μM).

3.6.5.3. Cuantificación de nitritos.

Se estimó la producción de óxido nítrico (NO) mediante el contenido de ion nitrito (NO_2^-) en los sobrenadantes de tejido a través del método de Griess. Se indujo la reacción colorimétrica mediante la adición de 100 μL de reactivo de Griess a 100 μL del sobrenadante de tejido y se ajustó la reacción a 1 ml con agua destilada. El producto de la reacción fue leído en un espectrofotómetro a 540 nm. La concentración de NO_2^- fue determinada interpolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de NaNO_2 (0.5 a 10 μM), la cual fue determinada paralelamente en cada ensayo.

3.7. Bioensayos de toxicidad en cebolla.

Se analizó el potencial citotóxico del agua contaminada de cada zona de estudio en bulbos de cebolla (*Allium cepa*) expuestos durante 120 horas (tratamiento agudo) a diferentes diluciones, con recambio cada 24 horas. Cada tratamiento estaba formado por un testigo (agua potable) y tres grupos experimentales (25 %, 50 % y 100 % de

concentración en volumen). Cada bulbo de cebolla fue colocado en vasos de plástico de 50 ml, por triplicado (figura 17).

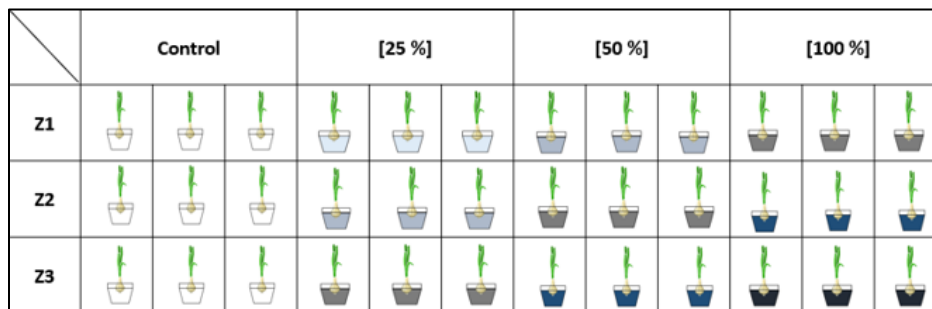


Figura 17. Diagrama de *Allium cepa* test para evaluar la citotoxicidad del agua del río Atoyac en las 3 zonas (Z1, Z2 y Z3) a diferentes concentraciones en volumen (25, 50 y 100 %).

Al final del tratamiento de cada raíz se cortaron 2 mm del meristemo apical y se fijaron en una solución de etanol-ácido acético (3:1) durante 24 horas. Los meristemos apicales se deshidrataron en etanol 70% (v/v) durante 15 min esto facilita que penetre mejor el HCl durante la hidrólisis, la cual se realizó con HCl 5M durante 30 min. Para eliminar el exceso de HCl y poder teñir las células, se decantó el HCl y se lavó 3 veces con agua destilada. La tinción se realizó con aceto-orceína por 40 min, y por último se agregó a los meristemos ácido acético al 45% (v/v) con la finalidad de eliminar el exceso de colorante. Posteriormente se realizó el aplastamiento de las raíces a monocapa para lo cual se colocó un cubreobjetos y se presionó ligeramente para que las células quedasen dispersas y no se encimaran unas con otras, y de esta manera facilitar su observación al microscopio (figura 18) para poder identificar, cuantificar las células y determinar los índices mitótico (IM) y de fases (IP, IME, IA, IT).



Figura 18. Fases del ciclo celular en meristemos de *Allium cepa* expuestos al agua del río Atoyac en las zonas de muestreo. (A) Profase; (B) Metafase; (C) Anafase; (D) Telofase; (E) Citocinesis.

Se estudió el efecto del agua del río Atoyac en las tres zonas de estudio, durante el ciclo celular (CC) de los meristemos radiculares de *Allium cepa*, por triplicado. El número total de células observadas fueron 1000, en cada grupo, y se compararon con su respectivo grupo testigo (Prieto *et al.*, 2009). Los índices se obtuvieron aplicando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Índice mitótico} = \frac{\text{No. de células en división mitótica}}{\text{No. total de células observadas}} * 100$$

$$\text{Índice de fases} = \frac{\text{No. de células en determinada fase}}{\text{No. total de células en mitosis}} * 100$$

3.8. Análisis estadístico.

Los resultados cuantitativos que se obtuvieron de los bioensayos están graficados como la media \pm error estándar de la media (EEM). El tratamiento estadístico de los resultados para ambos bioensayos se llevó a cabo con ayuda del programa Minitab19, por medio del cual se efectuó una comparación entre los grupos control y los grupos problema para cada concentración de las muestras por medio del estadístico ANOVA de una vía y un análisis posterior de Bonferroni con un nivel de significancia menor o igual a 0.05 ($p \leq 0.05$).

CAPITULO IV. RESULTADOS.

4.1. Distribución espacial de la industria

En la figura 19 se presenta la identificación y distribución de 448 industrias (tabla 2) generadoras de contaminantes tóxicos los cuales representan el 37 % del total de unidades económicas establecidas en la zona (DENUE, 2020). Aunque se observa un crecimiento generalizado del sector industrial en la región, el 74 % de las industrias contaminantes se concentran en SMTL (Z2), el 11 % en SMA (Z3), el 10 % en la localidad de SCT (Z1), y el 5 % se ubican en la localidad de VA (Z3). Estos resultados indican que el desarrollo industrial de la zona es generalizado, pero desigual con una tendencia marcada a crecer en las zonas periburbanas a SMTL.

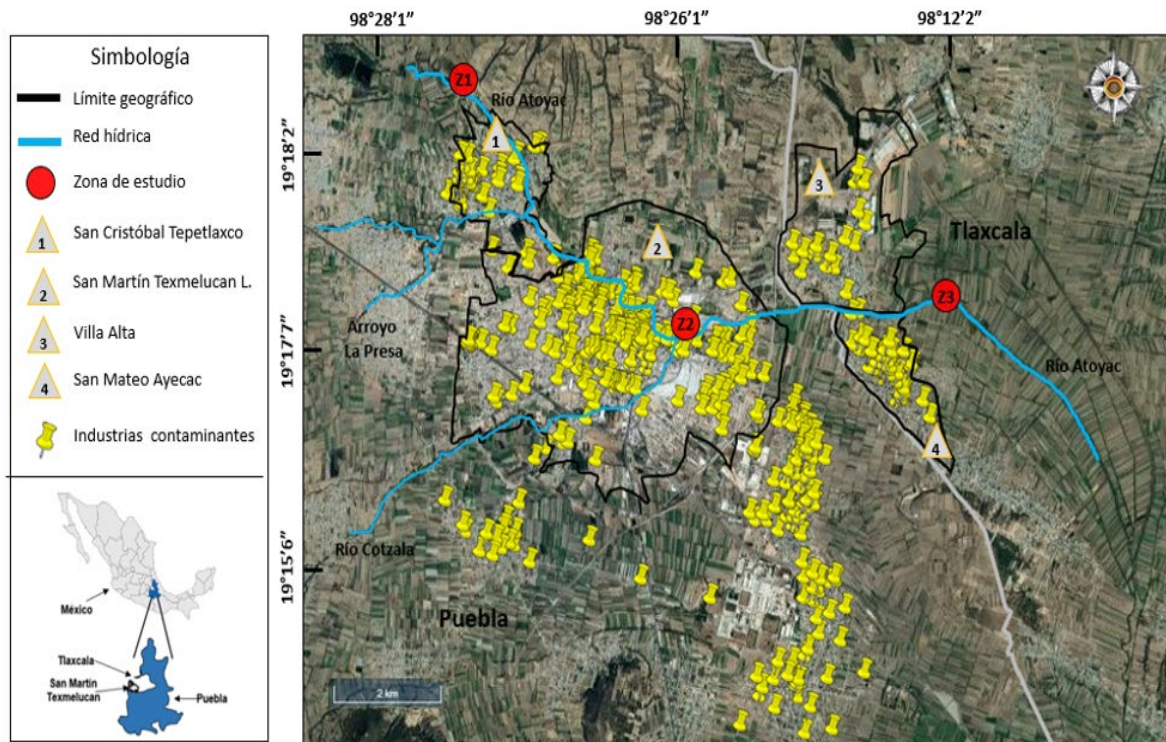


Figura 19. Vista panorámica de la distribución industrial en las zonas de estudio. (Fuente DENUE, 2019). Elaboración propia.

En términos de carga antropogénica el área de SMTL es la más agresiva debido a que es la parte más desarrollada de la zona y donde se encuentra el mayor número de unidades industriales. Y en teoría las localidades de SCT, SMA y VA periféricas a SMTL presentan el menor efecto de urbanización y se observa que el número de unidades industriales y zonas edificadas es menor.

4.2. Clasificación de la industria por zona de estudio.

La tabla 2 y figura 20 muestran el número de industrias y los contaminantes que emiten los diferentes tipos de las actividades económicas manufactureras y de la construcción, en las localidades de la zona de estudio. Fueron identificadas catorce de las veinte actividades manufactureras en que está clasificada la industria en México de acuerdo con el Sistema de Clasificación Industrial de América del Norte (SIAN, 2018) (ver anexo 3). Los sectores manufactureros como fabricación de maquinaria, equipo de computación, aparatos eléctricos y equipo de transporte están ausentes en la zona. Cabe aclarar que el sector de la construcción no está considerado como una actividad manufacturera, sin embargo, se contabilizó debido a que en la zona tiene una presencia significativa y emite vertidos muy altos de partículas en suspensión, grasas y aceites.

Del total de actividades económicas del sector manufacturero, SMTL cuenta con el 65 %, VA 55 %, SCT 30 % y SMA tiene el 25 %. Es importante mencionar que las actividades manufactureras de los giros textil y de fabricación de productos metálicos representan el 76 % del total de actividades industriales en la zona (figura 20).

También es importante resaltar que 3 de las industrias del ramo textil ubicadas en las zonas de estudio son macroempresas (con más de 250 trabajadores) el resto se clasifican como micro y pequeñas empresas (de 1 a 50 trabajadores) entre las cuales hay talleres informales de lavado y acabado de mezclilla, principalmente, en las localidades de San Martín Texmelucan Labastida y San Mateo Ayecac. En tanto que las empresas elaboradoras de productos de metal en su mayoría están representadas por talleres de herrería principalmente en SMTL y VA.

Tabla 2. Actividades manufactureras y de la construcción en zonas de estudio

Localidad	Actividad industrial	Desechos	N.º de Industrias	Total industrias
San Cristóbal Tepatlaxco (Z1)	Alimenticio y bebidas	Grasas, aceites, materia orgánica, sólidos suspendidos y nitrógeno amoniacal	21	45
	Construcción	Partículas de polvo, sílice, aluminio, hierro, oxido de calcio.	2	
	Metálica básica, productos metálicos	Metales pesados (cromo, aluminio, cadmio, zinc, plomo, mercurio)	13	
	Textiles e industria del cuero	Colorantes, sosa, cloro, peróxidos, metales pesados, contaminantes orgánicos, ácidos y bases	9	
San Martín Texmelucan Labastida (Z2)	Minerales no metálicos (alfarería y cerámica)	Colorantes, solventes y compuestos orgánicos volátiles	7	332
	Alimenticio y bebidas	Grasas, aceites, materia orgánica, sólidos suspendidos, nitrógeno amoniacal, bacterias y proteínas	13	
	Construcción	Partículas de polvo, sílice, aluminio, hierro, oxido de calcio.	5	
	Metálica básica, productos metálicos	Metales pesados (cromo, aluminio, cadmio, zinc, plomo, mercurio)	102	
	Productos de papel e imprenta	Residuos de tintas, barnices, disolventes y papel	37	
	Sustancias químicas, derivados de petróleo y plásticos	Compuestos orgánicos volátiles, partículas de polietileno, poliestireno, colorantes, orgánicos persistentes, metilmercurio, bifenilos policlorados, metales pesados, ácidos y residuos de medicamentos	11	
San Mateo Ayecac (Z3)	Textiles e industria del cuero	Colorantes, sosa, cloro, peróxidos, metales pesados, contaminantes orgánicos, ácidos y bases	157	49
	Construcción	Partículas de polvo, sílice, aluminio, hierro, oxido de calcio.	2	
	Metálica básica, productos metálicos	Metales pesados (cromo, aluminio, cadmio, zinc, plomo, mercurio)	3	
Villa Alta (Z3)	Textiles e industria del cuero	Colorantes, sosa, cloro, peróxidos, metales pesados, contaminantes orgánicos, ácidos y bases	44	22
	Alimenticio y bebidas	materia orgánica en forma de azúcar, benzoato de sodio como conservador, colorantes y saborizantes	2	
	Construcción	Partículas de polvo, sílice, aluminio, hierro, oxido de calcio.	2	
	Metálica básica, productos metálicos	Metales pesados (cromo, aluminio, cadmio, zinc, plomo, mercurio)	9	
	Productos de papel e imprenta	Residuos de tintas, barnices, disolventes, compuestos orgánicos como celulosa, cloro, haluros orgánicos, grasas y aceites	2	
	Sustancias químicas, derivados de petróleo y plásticos	Compuestos orgánicos volátiles, partículas de polietileno, poliestireno, colorantes, orgánicos persistentes, metilmercurio, bifenilos policlorados, metales pesados, ácidos y residuos de medicamentos	2	
Total	7	30	448	

La industria textil genera colorantes, ácidos, bases, cloro, peróxidos, metales pesados y contaminantes orgánicos; en tanto que las empresas de herrería liberan en sus procesos de soldadura mezclas de partículas finas de metales como Cr, Ni, As, Mn, Cd, Co, Cu, Zn,

Se, sílice, asbesto, acroleína, óxidos de nitrógeno y monóxido de carbono que son sumamente tóxicas. Las industrias de impresión son otra fuente contaminante importante para mencionar debido a que sus residuos son sumamente tóxicos y entre ellos tenemos tintas, barnices, disolventes los cuales contienen altas cantidades de COV's que también son productos que pueden generarse de los procesos manufactureros petroquímicos que, aunque en menor medida también están presentes en la zona de SMTL.

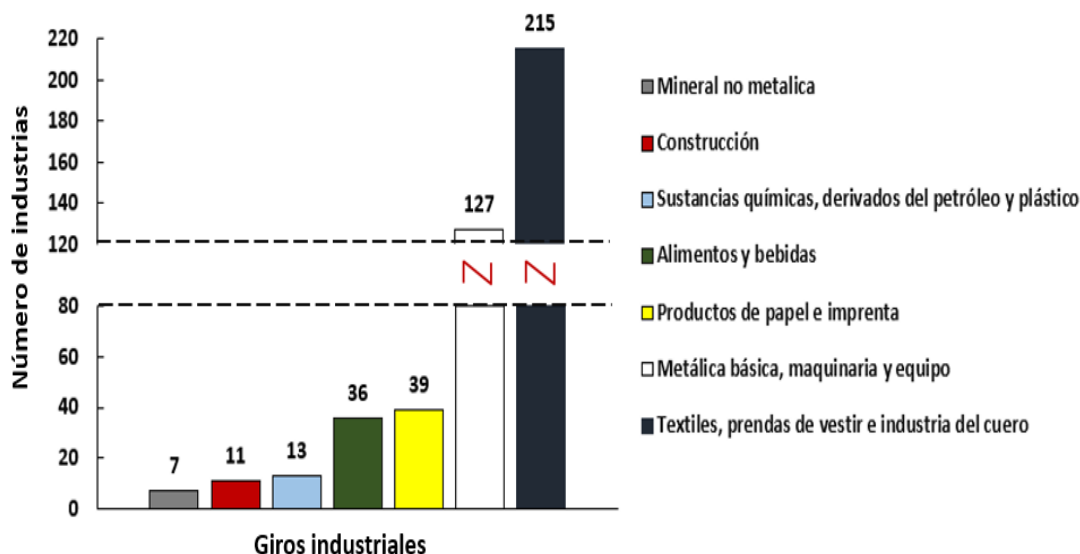


Figura 20. Giros industriales ubicados en las zonas de estudio. Fuente DENUE, 2020.

4.3. Densidad industrial y poblacional.

La figura 21 presenta los niveles de densidad industrial y poblacional en las tres principales localidades de la zona de estudio pertenecientes a los municipios de San Martín Texmelucan y Tepetitla de Lardizábal. Los resultados evidencian que la densidad poblacional en la localidad de SMTL perteneciente al municipio de San Martín Texmelucan, Puebla es 14 % mayor a la cantidad de habitantes que presentan combinadas las dos principales localidades (SMA y VA) del municipio de Tepetitla de Lardizábal en Tlaxcala. Sin embargo, con respecto a la densidad industrial los resultados indican que las dos principales localidades en el municipio de Tepetitla de Lardizábal tienen un mayor número de industrias por km² (densidad industrial) 16 % mayor con relación a las que presenta la localidad de SMTL en el municipio de SMT, a pesar de que las localidades de TL en conjunto tienen 4 veces menos superficie territorial con respecto a SMTL. El 90 % de las industrias en TL son talleres textiles formales e informales dedicados principalmente al acabado de prendas de vestir de mezclilla. Esta elevada concentración de población e industrias es un fenómeno que puede generar no sólo el incremento en la contaminación del aire, suelo y agua, también genera pobreza, pérdida del habitat y fuentes de alimentos (SEMARNAT, 2010)

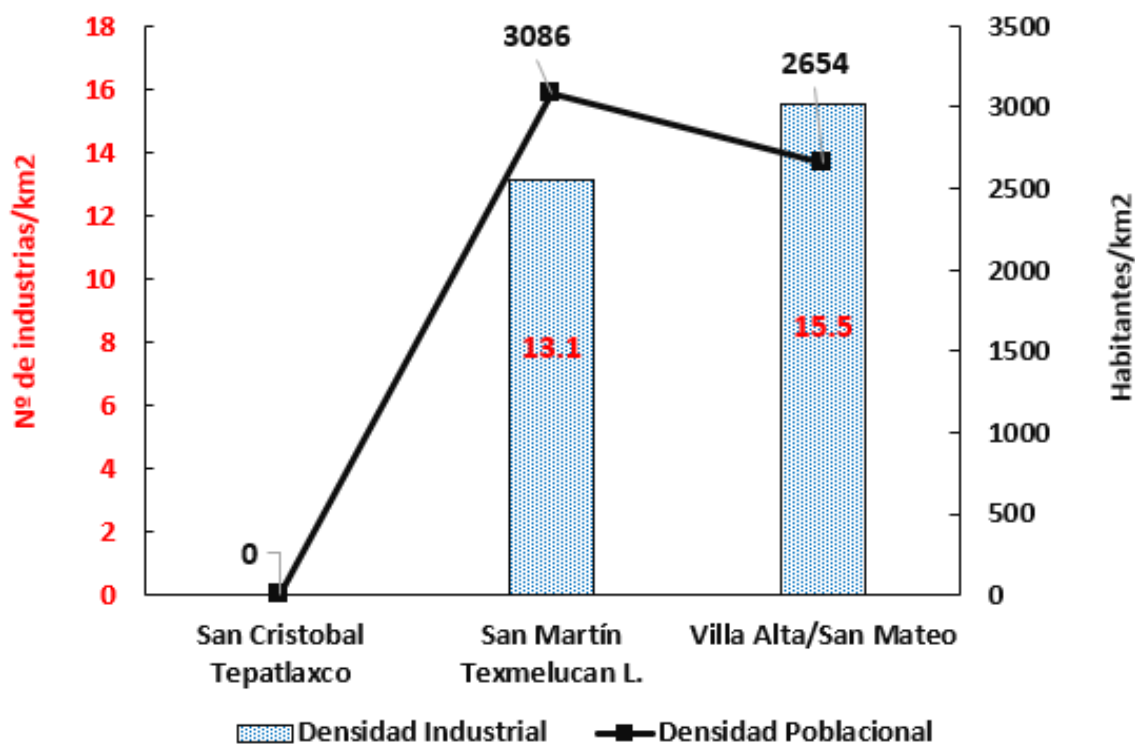


Figura 21. Densidad urbana en zonas de estudio. INEGI, 2020.

4.4. Caracterización fisicoquímica del agua en las zonas de estudio.

Tomando en consideración lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021 los parámetros fisicoquímicos como temperatura, pH, DBO₅ y DQO, la Z1 cumplió con todos ellos. Del mismo modo cumplen los criterios establecidos por CONAGUA para evaluar el índice de calidad del agua (ICA), lo que demuestra que el agua de la Z1 es de buena calidad y no se encuentra alterada en su composición.

Dado que en la Z1 la actividad antropogénica es mínima y los valores de los parámetros fisicoquímicos se encuentran dentro de los límites máximos permisibles (LMP) del NOM-001-SEMARNAT-2021, por consiguiente, en la Z1 la calidad del agua está clasificada de buena calidad y de acuerdo con la escala de clasificación de calidad de agua superficial para cuerpos de agua loticos de CONAGUA se consideró como zona de referencia.

Al comparar los resultados de las Z2 y Z3 con Z1 (tabla 3) se observó lo siguiente: la temperatura registró el valor promedio más alto, en la Z1 ($18 \pm 0.0^\circ\text{C}$) y no presentó diferencias significativas en relación con las Z2 ($12.3 \pm 0.4^\circ\text{C}$) y Z3 ($14 \pm 0.2^\circ\text{C}$) y se encuentran dentro de los LMP de la NOM-001-SEMARNAT-2021. Con respecto a la contaminación orgánica los parámetros de DBO₅ y DQO observaron incrementos significativos en las zonas 2 y 3 en relación con la Z1. Por ejemplo, el parámetro DBO₅ aumentó 390 % y 732 % en las zonas 2 y 3 respectivamente con relación a la Z1. Para el parámetro de DQO las zonas 2 y 3 presentaron incrementos significativos de 204 y 209 % en relación con la zona de referencia.

El parámetro de OD es crítico para la sobrevivencia de plantas y animales acuáticos el valor mínimo para un agua de buena calidad es de 50 % de saturación. Los valores de la muestra de agua de las zonas 2 y 3 indicaron disminuciones críticas de 78.5 y 89.5 %

respectivamente con relación a la Z1 lo que nos indica que no es posible la existencia de vida aerobia para los organismos acuáticos. En cuanto al valor de pH los valores determinados en las zonas 2 y 3 tuvieron una disminución de 23 y 20 % respectivamente con relación a la Z1, y no cumplen con LMP de las NOMs.

Otros parámetros que se analizaron y que no están contemplados por la NOM-001-SEMARNAT-2021 ni por el ICA de CONAGUA fueron la turbidez (TUB) y la conductividad eléctrica (CE), son dos parámetros que respectivamente indican la cantidad de partículas en suspensión y la concentración total de sólidos disueltos en el agua, su incremento fue significativo e indica desintegración de materia orgánica e inorgánica (Ospina *et al.*, 2015).

Tabla 3. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos del agua en las zonas de estudio.

Parámetros	San Cristóbal Tepatlixco Z1	San Martín Texmelucan Z2	Villa Alta Z3	*NOM-001- SEMARNAT- 2021	**ICA (CONAGUA) 2020
T (°C)	18 ± 0.0 ^a	12.3 ± 0.4 ^a	14 ± 0.2 ^a	35°C	-
pH (UpH)	6.5 ± 0.4 ^a	5.0 ± 0.1 ^b	5.2 ± 0.1 ^b	6.5 – 8.5	-
Ce (mS)	0.147 ± 0.002 ^a	0.252 ± 0.004 ^b	0.321 ± 0.017 ^c	-	-
TUB (NTU)	140.7 ± 17.3 ^a	173 ± 8.5 ^a	224.3.6 ± 16.7 ^b	-	-
DQO (mg/L)	62 ± 1.5 ^a	189 ± 1.4 ^b	192 ± 1.0 ^b	180	20<DQO<=40 (A) 40<DQO<=200 ©
DBO ₅ (mg /L)	7.0 ± 0.6 ^a	34.3 ± 1.9 ^b	58.3 ± 0.9 ^c	60	6<DBO<=30 (A) 30<DBO<=120 ©
OD (%)	55.0 ± 1.2 ^a	11.8 ± 1.1 ^b	5.9 ± 0.3 ^c	-	50<OD<=70 (BC) 10<OD<=30 © OD<=10 (FC)

*Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. **Índice de calidad del agua superficial de cuerpos de agua lóticos (ríos y arroyos). BC=Buena calidad. A=Aceptable. C=contaminada. FC= Fuertemente contaminada.

Parámetros que no comparten letras son estadísticamente diferentes.

El análisis estadístico fue por ANOVA de un factor, post hoc de Tukey $p \leq 0.05$. Los datos representan las medias de los valores \pm el EEM (error estándar de la media).

La turbidez mostro un incremento significativo en las zonas Z2 (23.6 %) y Z3 (60 %) y la conductividad también aumentó 71.4 y 118 % respectivamente en relación con la Z1.

4.5. Metales pesados y arsénico en el agua de las zonas de estudio.

En la tabla 4 se presentan los valores de As y de 7 metales pesados Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb y Zn evaluados en las 3 zonas de estudio. Los resultados indicaron que sólo el 12 % de los parámetros cumplieron con los LMP por la NOM-001-SEMARNAT-2021. En ninguna

de las tres zonas de estudio el As, Cd, Cr, Hg, Pb y Zn cumplieron con los LMP de la NOM. En la Z1 solamente Cu y Ni se encontraron dentro de los LMP por la NOM, y en la Z2 el Ni fue el único parámetro que estuvo dentro del LMP.

Tabla 4. Concentración de Metales Pesados y arsénico en las zonas de estudio.

Parámetros	San Cristóbal Tepatlaxco Z1	San Martín Texmelucan Z2	Villa Alta Z3	*NOM-001-SEMARNAT-2021	**CONAGUA Agua Subterránea
As (mg/L)	0.4	0.7	1.7	0.1	As>0.025 NA como FAP
Cd (mg/L)	0.3	0.4	0.9	0.1	Cd>0.005 NA como FAP
Cu (mg/L)	3.8	4.8	8.8	4.0	-
Cr (mg/L)	1.3	1.5	7.5	0.5	Cr>0.05 NA como FAP
Hg (mg/L)	0.02	0.2	1.2	0.005	Hg>0.006 NA como FAP
Ni (mg/L)	1.9	1.9	6.9	2.0	-
Pb (mg/L)	1.5	2.3	7.3	0.2	Pb>0.01 NA como FAP
Zn (mg/L)	10	11.0	25	10	-

* Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. ** Escala de clasificación del índice de calidad de agua subterránea, CONAGUA 2020. FAP= Fuente de agua potable.

Para determinar si el agua del río Atoyac puede considerarse como fuente de agua potable (FAP) se tomaron como referencia los criterios de CONAGUA para la evaluación del ICA en agua subterránea (tabla 4). Los resultados indicaron que en ninguna de las 3 zonas la concentración de As, Cd, Cr, Hg y Pb cumplieron con los criterios del ICA.

En la figura 22, se presenta el incremento progresivo en las concentraciones de As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb y Zn en las zonas de estudio. El mayor incremento de los parámetros con respecto a la zona de referencia se presentó en la Z3 (SMTL) de la siguiente manera: As 325 %, Cd 300 %, Cu 132 %, Cr 477 %, Hg 5900 %, Ni 263 %, Pb 387 % y Zn 150 %. Estos resultados evidencian que la zona 3 es la más crítica a su vez, esta situación se encuentra asociada directamente con el incremento de las actividades antropogénicas en la zona de estudio (tablas 1, 2 y 3) por lo que se evidencia la presencia y el incremento en la concentración de metales tóxicos y COV's a causa de la actividad industrial y poblacional de la zona.

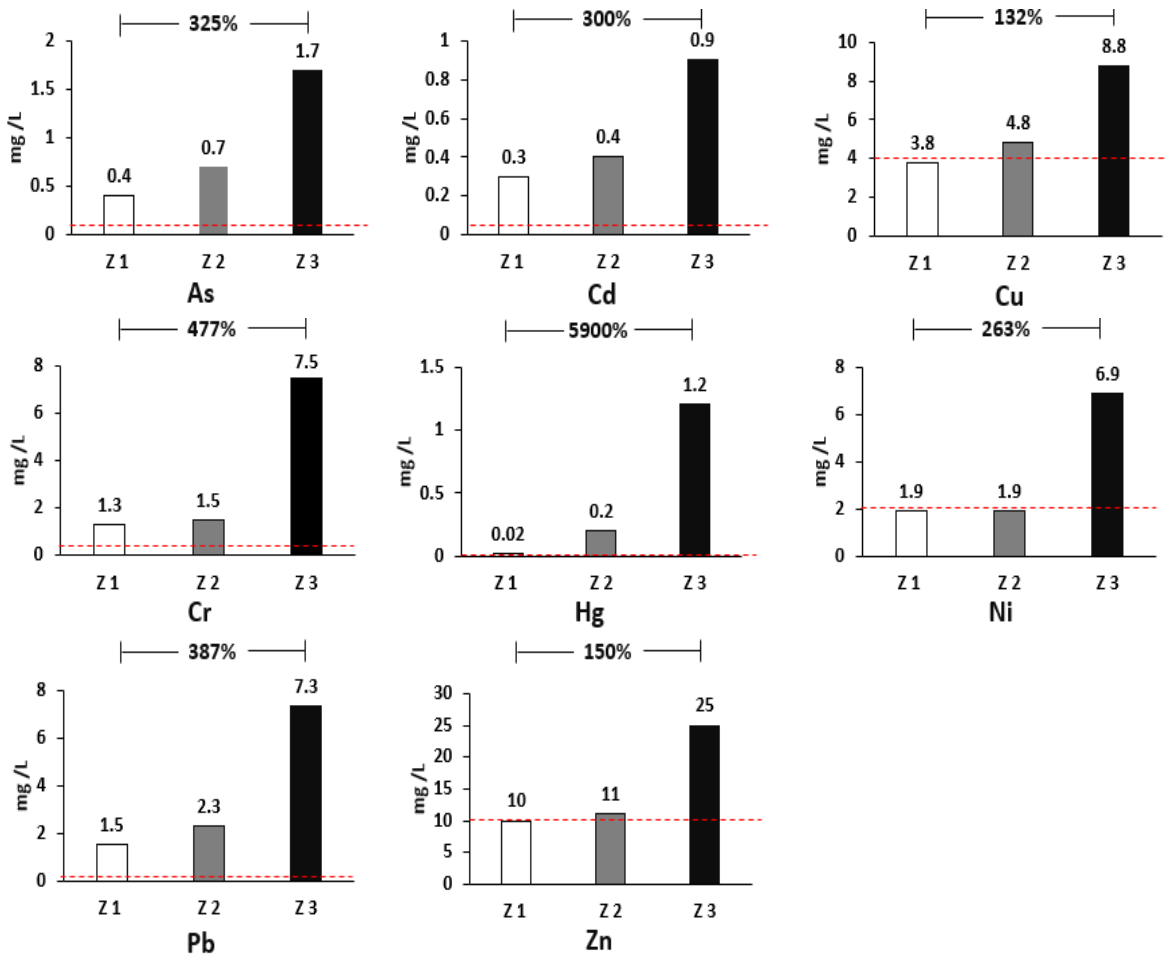


Figura 22. Porcentaje del incremento de las concentraciones de arsénico y metales pesados en las zonas de estudio.

----- LMP de NOM-001-SEMARNAT-1996.
 |-----| % de incremento de Z1 a Z3

4.6. Compuestos orgánicos volátiles (COV's).

La tabla 5 presenta los productos obtenidos del análisis de COV's en el agua de las 3 zonas de muestreo. Se analizaron un total de once compuestos en base a las directrices que contempla la NMX-AA-103-SCFI-2006. Los resultados indicaron que el 76 % de los parámetros no cumplen con los LMP establecidos por la NMX. En la zona 1 los parámetros de benceno, Clorobenceno, 1,4 Diclorobenceno y 1,2 Dicloroetano no cumplen los estándares de la NMX. En tanto que en la zona 2 no cumplieron los LMP los parámetros de benceno, 1,4 Diclorobenceno, 1,2 Dicloroetano y Hexaclorobutadieno. En la Z3 en relación con la zona de referencia Z1. Se observaron aumentos significativos en las concentraciones de los parámetros analizados.

Tabla 5. Compuestos orgánicos volátiles en las tres zonas de estudio.

Parámetros (µ/L)	San Cristóbal Tepatlaxco Z1	San Martín Texmelucan Z2	Villa Alta Z3	*NMX-AA-103-SCFI-2006
Benceno	0.02	0.03	0.51	0.03
Clorobenceno	0.02	0.04	0.40	0.03
Cloroformo	0.05	0.05	0.30	0.04
Cloruro de vinilo	0.05	0.05	0.45	0.04
1,4 Diclorobenceno	0.04	0.04	0.32	0.04
1,2 Dicloroetano	0.01	0.02	0.28	0.02
1,1 Dicloroetileno	0.04	0.04	0.20	0.03
Hexaclorobutadieno	0.09	0.01	0.12	0.01
Tetracloroetileno	0.07	0.06	0.10	0.05
Tetracloruro de carbono	0.04	0.03	0.67	0.02
Tricloroetileno	0.03	0.03	0.70	0.02

***Norma Mexicana de Análisis de Agua, determinación de compuestos orgánicos volátiles en aguas residuales, naturales y potables. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial 2006.**

En la figura 23, se muestra el porcentaje del incremento en la concentración de COV's en las tres zonas de estudio. Al comparar la concentración en la Z3 de cada parámetro: benceno, clorobenceno, cloroformo, cloruro de vinilo, 1,4 Diclorobenceno, 1,2 Dicloroetano, 1,1 Dicloroetileno, Hexaclorobutadieno, Tetracloroetileno, Tetracloruro de carbono y Tricloroetileno fueron observados incrementos significativos de concentración de 2450, 1900, 500, 800, 700, 2700, 400, 33, 43, 1575 y 2233% respectivamente en relación con la Z1. Lo que demuestra nuevamente que la z3 es la zona con el mayor incremento de COV's.

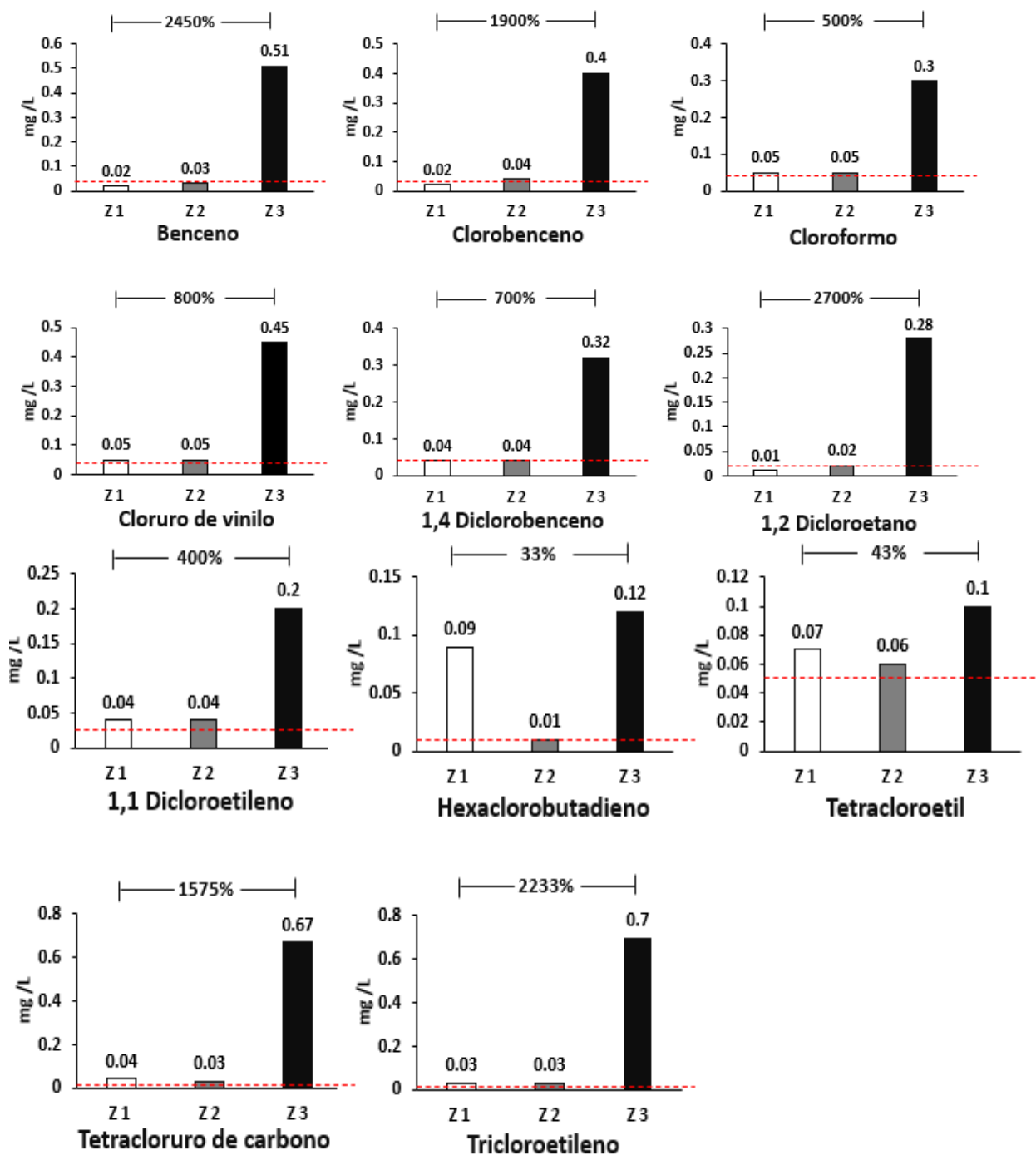


Figura 23. Porcentaje del incremento de las concentraciones de los compuestos orgánicos volátiles en las zonas de estudio.

--- LMP de NOM-001-SEMARNAT-1996.
 |—| % de incremento de Z1 a Z3

4.7. Evaluación de metalotioneínas en branquias e hígado.

Al determinar la concentración de metalotioneínas en los tejidos de branquias (figura 24A), se presentaron en todos los grupos incrementos con relación al grupo control, sin

embargo, solamente en el grupo de la Z3 el aumento de MT fue estadísticamente significativo (392 %). La figura 24B muestra el valor medio de la concentración de MT en hígado correspondiente a cada zona de muestreo. El valor de MT aumentó significativamente en el grupo Z3 (256 %) con relación al grupo control.

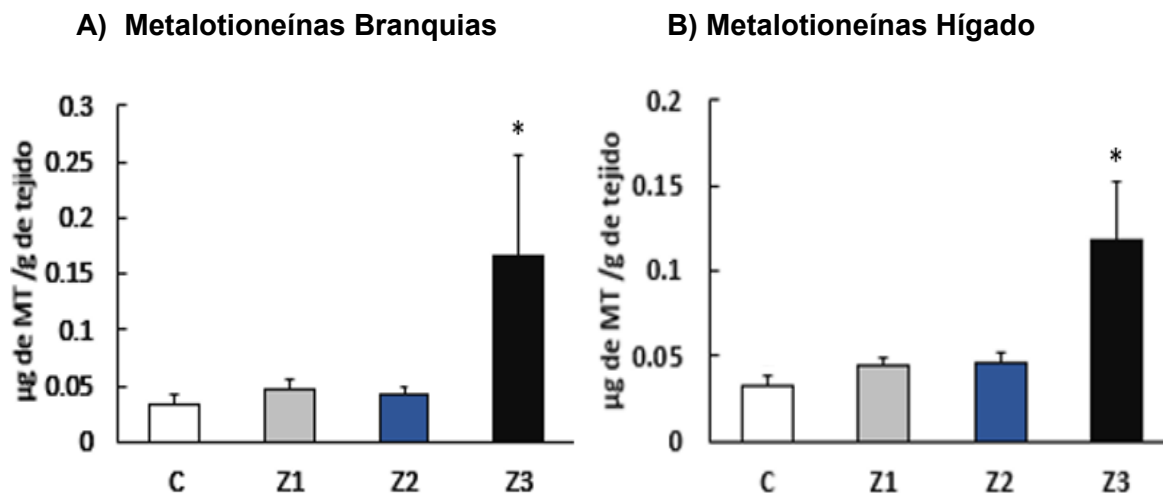


Figura 24. Concentración de metalotioneínas (MT) en branquia (A) e hígado (B) de *Danio rerio* expuestos al agua del río Atoyac al 100 % de concentración. (*) indica diferencia significativa a $p < 0.05$ respecto al grupo control por un análisis de ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni. C: Grupo control, Z1: Zona 1, Z2: Zona 2, Z3: Zona 3.

4.8. Evaluación de malondialdehído en branquias e hígado de pez cebra.

Se determinó como marcador de peroxidación lipídica malondialdehído (MDA), la figura 24 muestra la concentración promedio de MDA por cada gramo de branquias (A) e hígado (B) de pez cebra expuesto a las aguas del Río Atoyac al 100 % de concentración de las tres zonas de estudio. En branquia (Fig. 25A), la concentración de MDA tuvo aumento en los tres grupos experimentales respecto al control, sin embargo, los incrementos fueron significativos sólo en los tratamientos Z2 (1217 %) y Z3 (1237 %). En hígado (figura 25B) los niveles de MDA aumentaron en los tres grupos experimentales con respecto al control, y solo fueron significativos los tratamientos Z2 y Z3 con 103 % y 124 % respectivamente.

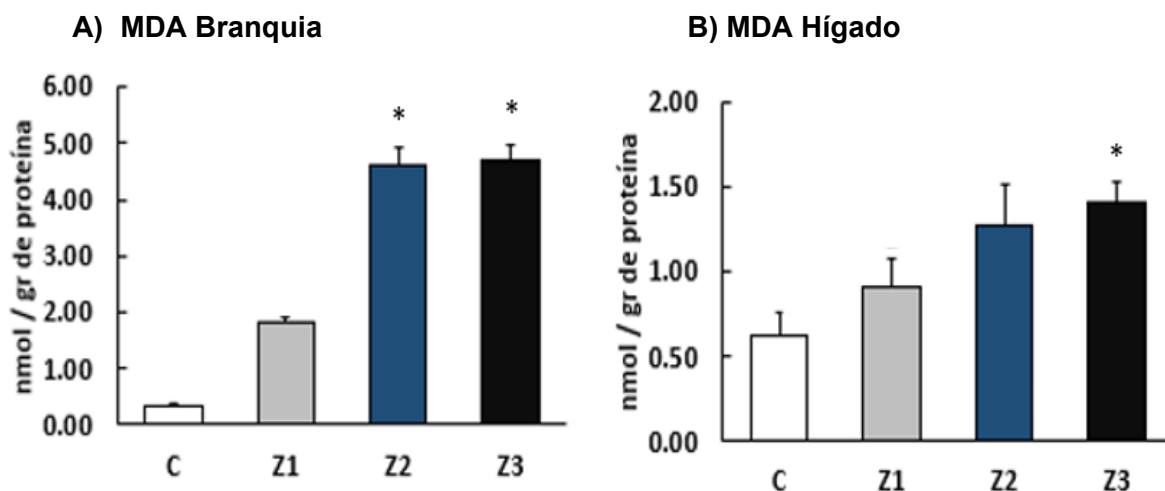


Figura 25. Concentración de malondialdehído (MDA) en branquia (A) e hígado (B) de *Danio rerio* expuestos al agua del río al 100 % de concentración. (*) indica diferencia significativa a $p < 0.05$ respecto al grupo control por un análisis de ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni. C: Grupo control, Z1: Zona 1, Z2: Zona 2, Z3: Zona 3.

4.9. Evaluación de óxido nítrico en branquias e hígado de pez cebra.

La determinación del contenido de NO_2^- en branquias (figura 26A) indicó incremento en los tres grupos experimentales con relación al grupo control y fueron significativos. Para Z1 405 %, Z2 549 % y Z3 1022 %. Con relación a la concentración promedio de NO_2^- hígado (figura 26B), se observó un incremento en relación con el control en los tres tratamientos, y únicamente fue significativo en el grupo Z3 con 608 %.

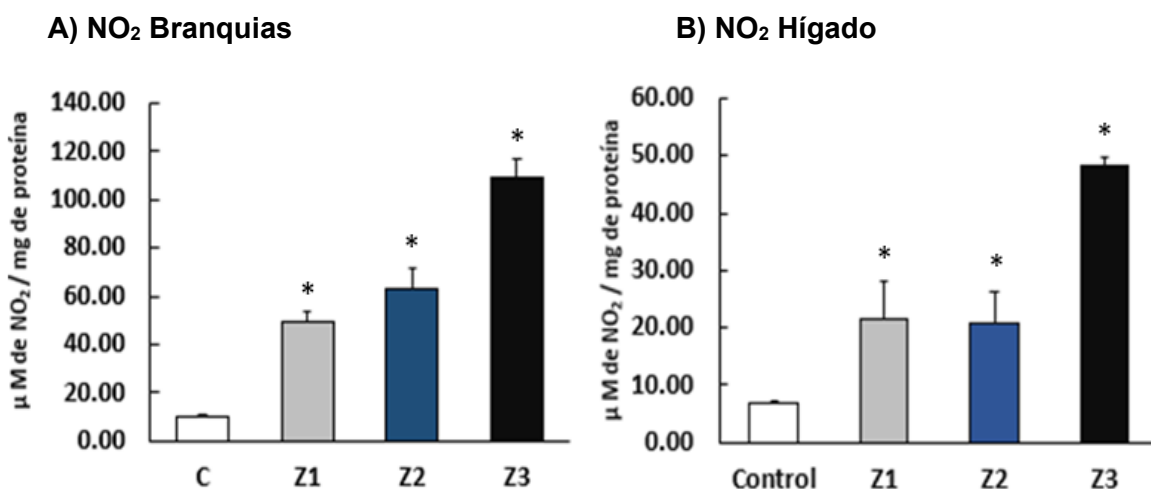


Figura 26. Concentración de nitrito (NO_2) en branquia (A) e hígado (B) de *Danio rerio* expuestos al agua del río al 100 % de concentración. (*) indica diferencia significativa a $p < 0.05$ respecto al grupo control por un análisis de ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni. C: Grupo control, Z1: Zona 1, Z2: Zona 2, Z3: Zona 3.

4.10. Evaluación citotóxica en *Allium cepa*.

En la tabla 6 y figuras 27 y 28 se muestran los resultados de la media y el error estándar de la media (EEM) del número de raíces y la longitud en *Allium cepa*, expuestas al agua del río, en cada una de las zonas de estudio durante 120 horas (tratamiento agudo). En la zona 1, el mayor número de raíces se observó en la concentración del 50%, y fue significativa en comparación con el grupo control con un aumento del 60 %.

La longitud de las raíces fue menor en la concentración del 100% presentó 28 % de disminución en comparación al grupo control. En la zona 2, los grupos experimentales no presentaron diferencias significativas en el número de raíces en relación con el grupo control. La longitud de las raíces en la concentración del 25% fue mayor mostrando un incremento de 48 %, y en la concentración del 100% hubo una disminución significativa del 37 % en comparación con el grupo control.

Tabla 6. Promedio del número de raíces y su longitud de *A. cepa* expuesta a 120 horas en las zonas de estudio.

Zonas de estudio	Grupos Exp.	N° de raíces *M ± DS	Longitud raíces (cm) *M ± DS	*p – valor N° de raíces	*p – valor longitud de raíces (cm)
Z1	C	10.0 ± 0.8 ^a	3.74 ± 0.17 ^a	0.020	0.003
	25	12.0 ± 2.4 ^a	3.81 ± 0.09 ^a	0.020	0.003
	50	16.0 ± 1.7 ^b	3.53 ± 0.33 ^a	0.020*	0.003
	100	9.0 ± 2.4 ^a	2.70 ± 0.16 ^b	0.020	0.003*
Z2	C	9.7 ± 1.2 ^a	4.41 ± 0.16 ^a	0.287	0.002
	25	10.0 ± 1.6 ^a	6.51 ± 0.95 ^b	0.287	0.002*
	50	12.0 ± 1.4 ^a	5.47 ± 0.74 ^a	0.287	0.002
	100	9.0 ± 1.6 ^a	2.80 ± 0.29 ^c	0.287	0.002
Z3	C	8.3 ± 1.2 ^a	4.81 ± 0.33 ^a	0.014	0.000
	25	11.0 ± 2.2 ^a	4.49 ± 0.28 ^a	0.014	0.000
	50	4.7 ± 0.5 ^b	2.15 ± 0.12 ^b	0.014*	0.000*
	100	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0*	0.0*

M ± DS =Media y desviación estándar

Parámetros que no comparten letras (a, b, c) son estadísticamente diferentes.

*** p-valor = probabilidad de la prueba ANOVA; p < 0.05.**

En la zona 3, el número de raíces y su longitud fue menor en el grupo del 50% con disminuciones del 43 y 55 % respectivamente y fueron significativos en comparación al grupo control. En la concentración del 100% no se presentó crecimiento radicular (Tabla 6 y figura 27).

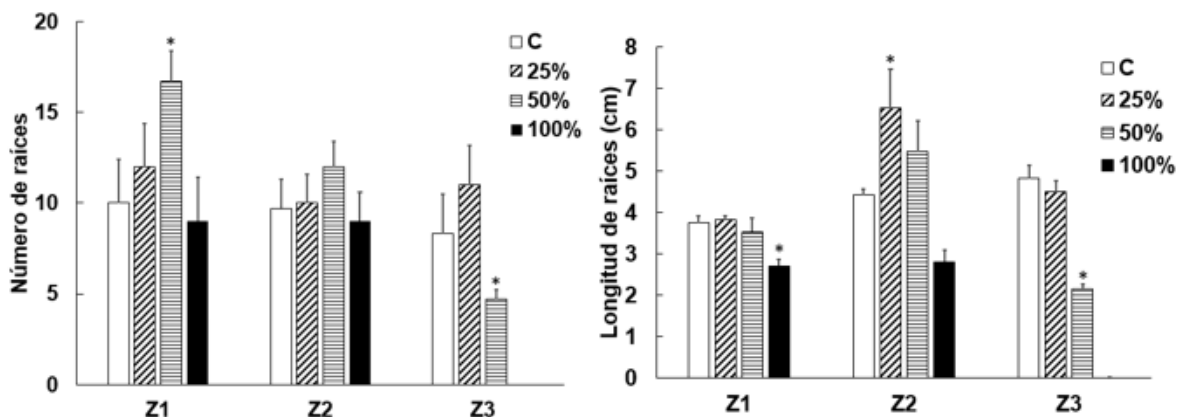


Figura 27. Promedio del número y longitud de raíces de *A. cepa* a 120 horas de exposición en las zonas de estudio. * $p \leq 0.05$.

4.11. Índices mitóticos y de fases

El IM, está caracterizado por el número total de células en división. Se estudió el efecto en el ciclo celular (CC) de los meristemos radiculares de *Allium cepa*, en las tres zonas de estudio. En la tabla 7 y figuras 28 y 29 se presentan los porcentajes promedios del IM e interfásico II. Se observó, la tendencia, que en la medida que se incrementa la concentración, el IM disminuye y el II aumenta.

Tabla 7. Promedio del Índice Mitótico (IM), índice Interfásico (II) e índice de fases (IP=índice profásico; IMe=índice metafásico; IA=índice anafásico; IT= índice telofásico).

		Ciclo celular					
		Mitosis				Índices	
Zona de estudio	Grupos Exp.	IP M ± DS	IMe M ± DS	IA M ± DS	IT M ± DS	II M ± DS	IM M ± DS
Z1	C	91.5 ± 1.4 ^a	3.5 ± 0.4 ^a	3.1 ± 0.4 ^a	2.0 ± 0.6 ^a	45.7 ± 0.5 ^a	54.3 ± 0.5 ^a
	25%	91.1 ± 0.5 ^a	3.9 ± 0.2 ^a	3.4 ± 0.4 ^a	1.7 ± 0.3 ^a	46.4 ± 0.9 ^a	53.6 ± 0.9 ^a
	50%	91.5 ± 1.3 ^a	4.1 ± 0.2 ^a	2.7 ± 0.8 ^a	1.8 ± 0.4 ^a	48.4 ± 0.9 ^a	51.6 ± 0.9 ^a
	100%	93.1 ± 2.1 ^a	2.7 ± 0.7 ^a	2.6 ± 0.7 ^a	1.5 ± 0.8 ^a	45.7 ± 1.1 ^a	54.3 ± 1.1 ^a
Z2	C	92.2 ± 1.5 ^a	3.1 ± 0.3 ^a	2.9 ± 0.7 ^a	1.8 ± 0.6 ^a	46.2 ± 0.5 ^a	53.8 ± 0.5 ^a
	25%	91.7 ± 1.7 ^a	3.4 ± 0.1 ^a	2.3 ± 0.4 ^a	1.9 ± 0.3 ^a	45.3 ± 0.2 ^a	54.3 ± 0.2 ^a
	50%	94.2 ± 1.3 ^a	2.2 ± 0.2 ^b	2.1 ± 0.7 ^a	1.5 ± 0.4 ^a	53.5 ± 0.2 ^b	46.5 ± 1.4 ^b
	100%	96.3 ± 0.5 ^b	1.5 ± 0.3 ^b	1.6 ± 0.2 ^a	0.6 ± 0.4 ^a	58.0 ± 0.2 ^c	42.0 ± 0.7 ^c
Z3	C	93.6 ± 0.4 ^a	3.1 ± 0.3 ^a	1.9 ± 0.2 ^a	1.4 ± 0.2 ^a	45.9 ± 0.1 ^a	54.1 ± 0.3 ^a
	25%	95.0 ± 0.6 ^a	2.3 ± 0.2 ^a	1.7 ± 0.3 ^a	1.1 ± 0.2 ^a	56.2 ± 0.1 ^b	43.8 ± 0.7 ^b
	50%	96.0 ± 1.2 ^b	1.4 ± 0.4 ^b	1.7 ± 0.2 ^a	1.0 ± 0.6 ^a	58.4 ± 0.2 ^c	41.6 ± 0.8 ^c
	100%	-	-	-	-	-	-

M ± DS =Media y desviación estándar.

Las medias que no comparten una letra (a, b, c) son significativamente diferentes. El número de fases se determinó al contabilizar 2000 células de *A. cepa* por grupo.

En la tabla 7 y figura 28, se observó que el IM de *A. cepa* fue de 54.3 ± 0.5 , en el grupo control de la Z1, estos valores indican que, por cada 100 células, 54 ingresan a división celular. Por consiguiente, valores inferiores indican citotoxicidad del agua, pues afecta el número de células que ingresan a la división; valores superiores señalan un efecto contrario de inducción de la reproducción celular. Por consiguiente, en la Z1, el IM en las diferentes concentraciones no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control. En la Z2, el IM fue mayor en la concentración del 25%, el resto de las concentraciones fue menor en comparación a su grupo control. En la Z3, en todas las concentraciones las poblaciones celulares que entran en mitosis (IM) disminuyen con respecto al grupo control y en la concentración 100% hay inhibición del crecimiento celular con respecto al control.

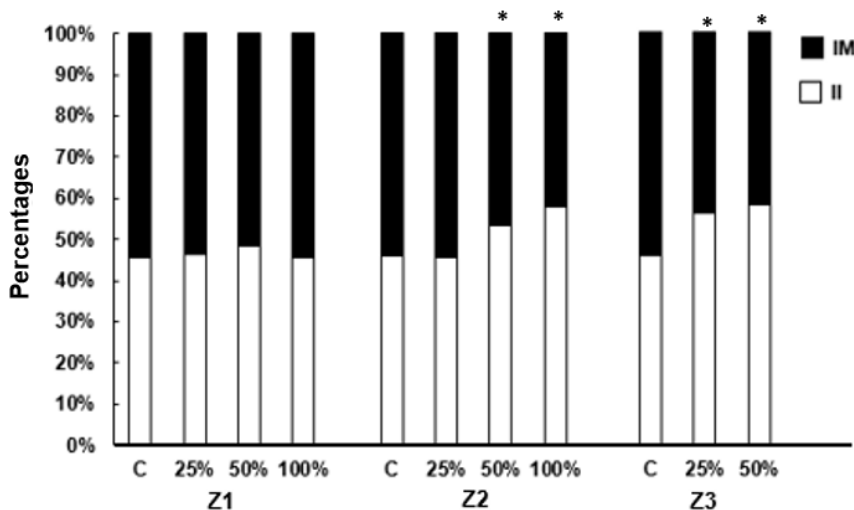


Figura 28. Índice mitótico e índice interfásico de la población celular de *A. cepa* * $p \leq 0.05$.

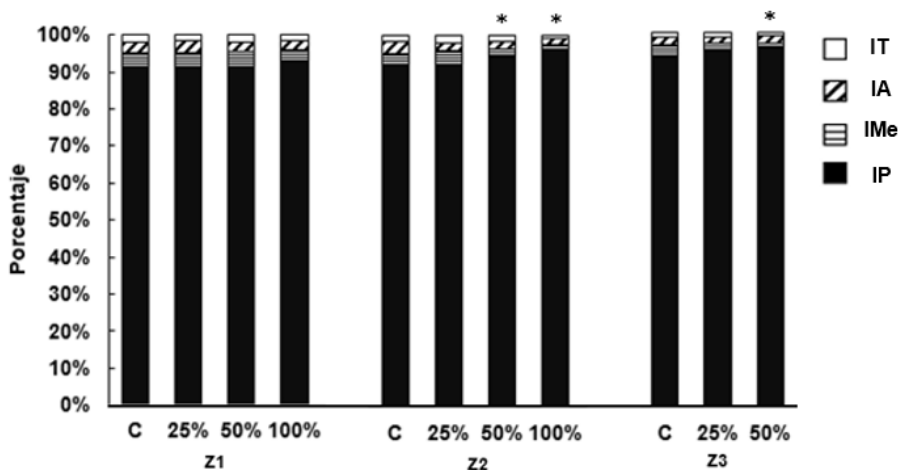


Figura 29. Índices de fases mitóticas de la población celular de *A. cepa*. IT = Índice telofásico; IA = Índice anafásico; IMe = Índice metafásico e IP = Índice profásico. * $p \leq 0.05$.

En la zona 1 los índices de fases fueron semejantes al grupo control. En la zona 2 el IP del 100 % fue mayor y el IMe del 50 % y 100 % fue menor y estas diferencias fueron significativas con relación al grupo control. En la zona 3 el IP del 50 % fue mayor y significativo en relación con el grupo control y el IMe del 50 % fue menor y significativo con el grupo control. La tendencia en los valores de los IA e IT fue en disminución en las tres zonas de estudio y en las concentraciones con relación a su correspondiente grupo control (Tabla 7 y figura 28)

CAPITULO V. DISCUSIÓN

La rápida urbanización, el crecimiento industrial y poblacional acelerado han propiciado el incremento de los volúmenes de descargas de aguas residuales tanto de origen doméstico como industrial. Esta situación, por un lado, ha contribuido de manera importante en aplicar a discreción las NOM o no aplicarlas. Las descargas realizadas por la industria contienen grandes cantidades de materia orgánica y diferentes compuestos químicos que al ingresar en los ecosistemas acuáticos como los ríos forman mezclas contaminantes complejas y tóxicas (Hua *et al.*, 2016). Numerosos estudios han investigado los daños en la calidad del agua durante los procesos de industrialización y el incremento poblacional. Zhang *et al.*, (2017) encontró que la industrialización y expansión urbana cambió la calidad del agua en el Delta del río Pearl. Alambgir *et al.*, (2022) reportó que la calidad en el agua del río Turag, que fluye a lo largo de la ciudad de Dhaka, ha disminuido rápidamente debido al desarrollo económico acelerado basado en la industrialización, la rápida urbanización y el crecimiento de la población.

En la presente investigación se logró identificar la distribución de las industrias contaminantes así como la concentración poblacional en las localidades de San Martín Texmelucan y Tepetitla de Lardizabal (Figuras 1, 2), que son dos factores que en los últimos 40 años se han incrementado e incidido en un crecimiento urbano acelerado y desordenado de la región ocasionado el aumento y diversificación de vertidos contaminantes urbanos e industriales en la corriente del río Atoyac, lo cual ha producido enorme deterioro en la calidad del agua. Se encontró que en la zona de SMT y TL prevalecen las actividades textiles y metalúrgicas situación que condiciona el perfil contaminante del río que recibe de estas industrias elevados volúmenes de agua residual con altas concentraciones de agentes xenobióticos como MP (Figura 4) y COV's (Figura 5). Adicionalmente las descargas domésticas de las zonas urbanas y periurbanas emiten grandes cantidades de materia orgánica, lo que impacta severamente el estado fisicoquímico del agua en el río Atoyac como lo indican los resultados del análisis realizado.

Estos resultados coinciden con los de otros investigadores como Sufia & Ashraf (2021); Caro *et al.*, (2021) y Chamarra & Koichi (2018) quienes han demostrado que el deterioro en los ríos es consecuencia de una compleja interacción entre la infraestructura, los problemas sociales, legales, económicos y hasta políticos que se pueden presentar durante un proceso de rápida urbanización e industrialización como ha sucedido en los últimos 40 años en municipios del SMT y TL. En este trabajo se reporta que la localidad de SMA ubicada en la zona de estudio 3 (Figura 1) tiene el mayor índice de densidad industrial y poblacional con respecto a su superficie territorial (Figura 6), y de acuerdo con los resultados del análisis fisicoquímico mantiene una correlación positiva con relación a la mayor concentración de contaminantes que afectan la calidad del agua del río (Tabla 1). Estos resultados concuerdan con los de Bravo *et al.*, (2015), Sandoval *et al.*, (2009) y Pérez *et al.*, (2018) quienes en sus investigaciones determinaron que el mayor deterioro de la calidad del agua en el Río Atoyac se presenta en zonas cercanas a las localidades urbanas e industriales.

La calidad del agua puede interferir en el metabolismo o cambiar las propiedades estructurales de las moléculas en los sistemas biológicos (Bianchi *et al.*, 2011). Por lo que la determinación de algunos parámetros fisicoquímicos en el agua contaminada de los ríos que están expuestos altos niveles de contaminantes puede ayudar a soportar los resultados obtenidos en una evaluación ecotoxicológica con biomodelos como es el caso de la presente investigación.

En este trabajo se reporta que los valores de temperatura del agua registrados en las zonas de estudio se encontraron dentro de lo establecido por la NOM y por consiguiente no es un factor que pueda afectar la calidad en el agua. Con respecto a los parámetros de DBO₅, DQO y OD en la zona de referencia cumplen con los LMP por la NOM-001-SEMARNAT-1996. Esto se debe a que las actividades industriales y comerciales son limitadas (DENUE, 2020) por lo tanto la capacidad auto depurativa del río en esa sección es suficiente para mantener los niveles mínimos de OD para sostener vida acuática. Sin embargo, de acuerdo con el criterio de la CONAGUA para el ICA la Z1 no se cumple con el parámetro de DQO por lo que el agua del lugar clasifica como agua contaminada. En las zonas de estudio 2 y 3, los resultados del análisis fisicoquímicos evidencian un alto grado en el deterioro del agua. Destacan los altos niveles de materia orgánica (DBO₅ y DQO) y condiciones anoxicas (OD).

Estos resultados coinciden con los reportados por Martínez *et al.*, (2017) quien determinó condiciones anoxicas con valores de 0 a 0.58 mgL⁻¹ tanto en temporada de lluvias como de estiaje en la zona alta y de confluencia del río Atoyac con el río Zahuapan debido a la alta demanda de oxígeno para la mineralización de las enormes concentraciones de materia orgánica (DBO₅ y DQO) presente en la zona debido a la extensa contaminación por aguas residuales de las actividades domésticas e industriales. Por causa de esta condición anoxica es imposible el sustento de flora y fauna acuática ya que el valor mínimo necesario para evitar efectos adversos en los organismos acuáticos es del 80 % de saturación a 20 °C y 1atm obien de 5 a 6 mgL⁻¹ (Pérez *et al.*, 2018). El aumento de los parámetros de CE y TUB en las zonas 2 y 3 se debe también a la alta concentración de materia orgánica, y a que los microorganismos, especialmente bacterias al oxidar los altos contenidos de material orgánico trae como consecuencia el aumento de residuos en suspensión lo que ocasiona que los niveles de transparencia disminuyan y la CE se incremente (Déniz, 2010).

Este comportamiento coincide con lo reportado por Pérez *et al.*, 2019 quien cuantificó altos valores de turbidez y Ce en zonas del río Atoyac que se encuentran vinculadas a concentraciones altas de materia orgánica provenientes de aguas residuales domésticas e industriales. El valor de pH en las tres zonas de estudio fue de carácter ácido sin embargo en la Z1 fue casi neutro y cumplió con los LPM de la NOM. Las zonas 2 y 3 presentaron un pH significativamente más ácido lo cual es perjudicial para el ecosistema acuático y se le puede atribuir a las actividades industriales ya que es muy probable que la disminución de los iones de hidrogeno este asociado al uso de agentes auxiliares de algunos procesos textiles que predominan principalmente en la zona 3 como son agentes reductores, blanqueadores, humectantes, desengrasantes y antiestáticos.

Estos resultados concuerdan parcialmente con los reportados por Martínez *et al.*, (2017) quien determinó valores de pH en el río en SMT cercanos a 10.24 unidades de pH como

resultado de los diferentes procesos industriales de la zona como la metalmecánica y textil que en sus procesos de lavado utilizan grandes cantidades de sosa caustica, la cual tiene un pH cercano a 13.5. Hernández (2016) reportó en la localidad de Villa Alta en época de lluvia valores promedio de pH 6,94 que son similares a los registrados en la presente investigación en época de estiaje (5.2 ± 0.4), esta variación pudo deberse a que en la época de lluvias el pH tiende a incrementarse por la dilución de los contaminantes al aumentar el caudal del río (Tabla 3). En este estudio encontramos marcadas diferencias en la concentración de As y MP en las tres zonas de estudio (Tabla 4). El 94 % de los 16 parámetros analizados en las zonas 2 y 3 no cumplen los LMP por la NOM y haciendo la comparación con criterios de la CONAGUA los parámetros As, Cd, Cr, Hg y Pb no son aceptables para un agua potable. Hubo incrementos 7 y 5 veces mayores de As y MP respectivamente en la zona 2, y de 32 y 48 veces más en la zona 3; esto se debe a la alta densidad industrial y a la gran diversidad de descargas que recibe esa sección del río principalmente de ramo textil y metalúrgico.

Mención especial debemos hacer acerca del Hg que en ninguna zona de estudio cumplió con los LMP de la NOM y tuvo aumentos de 900 y 5900 % en las zonas 2 y 3 respectivamente en relación con la zona 1, y se debe a los vertidos de fuentes antropogénicas de Hg como son la industria del papel y las dedicadas a procesos de recubrimientos metálicos (Gaiolia *et al.*, 2012); industrias que se encuentran presentes en las zonas 2 y 3. Esta situación es bastante preocupante y peligrosa para la salud de los habitantes de la zona debido a que metales como el Cd y Cr están clasificados en el grupo 1 por el Centro Internacional de Investigaciones Contra el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés: *International Agency for Research on Cancer*) como cancerígenos para los seres humanos. El Hg es un metal extremadamente tóxico que al ingresar al organismo de los seres vivos produce efectos neurotóxicos induciendo síntomas graves como pérdida de visión periférica, descoordinación de movimientos, disfunción para hablar, disfunción auditiva, debilidad muscular y en caso extremo produce el deceso del organismo (EPA, 2020; Sandoval *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2018) determinaron que la concentración de MP en las localidades del Alto Atoyac no representaban un riesgo ecológico para el sustento de vida acuática, ya que los valores que determinaron estaban debajo de los LMP por las NOMs.

Dichos valores fueron de 22 a 166 veces menores a los resultados de la presente investigación. Al cabo de 13 años en la misma zona de estudio, los valores han sufrido aumentos significativos. Las posibles causas de estos incrementos son el mayor de volúmenes de descargas residuales a consecuencia del crecimiento urbano, industrial y comercial. Pero, además la falta de infraestructura para el tratamiento de aguas residuales la cual no ha crecido de manera proporcional al aumento de la generación de vertidos (Vallejo, 2016). Los COV's analizados, en las zonas de estudio, presentaron diferencias espaciales significativas de concentración. Se registraron concentraciones 28 veces mayores en la Z3 con respecto a las zonas 1 y 2; esto se debe a la intensa industrialización presente en la zona donde se ubican los corredores industriales Quetzalcóatl, Ixtacuixtla y el Complejo Petroquímico Independencia, el cual produce metanol, tolueno y benceno (DENUE, 2020; Montero *et al.*, 2006). Sin embargo, el porcentaje de parámetros que cumplieron con las NOM en las zonas 1 y 2 fueron idénticos (64 %) aun cuando en la zona

1 no hay industrias contaminantes ni tampoco un índice alto de urbanización. La presencia de COV's en la zona agroforestal se podría deber al uso de pesticidas. De acuerdo con lo reportado por McDonald *et al.*, (2018) el 25 % de emisiones de COV's proviene de fuentes de productos químicos incluidos los agroquímicos.

Los resultados obtenidos de la presente investigación no concuerdan con lo reportado por Montero *et al.*, (2006) y Sandoval *et al.*, (2010) que detectaron concentraciones de COV's como cloroformo y benceno en las localidades de VA y SMA; y cuyos resultados estuvieron por debajo de los registrados en la presente investigación. Los COV's como el benceno y cloroformo encontrados en la zona son altamente peligrosos y están clasificados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) de la OMS como cancerígenos clase 1 para los seres humanos.

La EPA ha demostrado que el benceno al sobrepasar lo LMP causa efectos en el sistema nervioso, anemias, aberraciones cromosómicas y en casos extremos cáncer. Por otro lado, el cloroformo de acuerdo con la Agencia Para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) produce lesiones hepáticas, en el corazón, sistema nervioso y riñones. Hasta la fecha no se ha comprobado que el cloroformo tenga efectos mutágenos en los seres humanos. Sin embargo, la presencia de este tipo de compuestos en los ríos significa un alto riesgo ya que ingresan al aire, y pueden llegar con gran facilidad a zonas habitadas cercanas al río y, su inhalación puede ser causa de daño oxidativo y alteraciones proteicas (Galelli, 2000).

De acuerdo con Escobar (2003) la presencia de benceno y en el agua se debe a su descarga líquida de efluentes industriales, en la manufactura de metales no ferrosos y de textiles. El cloroformo se produce en grandes cantidades cuando se blanquea la celulosa con cloro en las industrias papeleras como las que están presentes en las zonas de estudio 2 y 3. Actualmente uno de los problemas ambientales de mayor impacto a nivel global es la contaminación de los recursos hídricos por MP, y es debido al alto potencial tóxico que presentan en los ríos y son considerados un serio problema para la salud de habitantes que interactúan directamente con dichos ríos (Pabón *et al.*, 2020).

A pesar de que algunos MP son esenciales para los sistemas biológicos, los altos niveles de exposición inducen daños a la salud humana, así como a la flora y fauna (Prieto *et al.*, 2009). El incremento en la concentración de MP en los ecosistemas acuáticos proviene de diversas fuentes antropogénicas, aumentando los efectos nocivos sobre los diferentes sistemas biológicos (Contreras, 2004). Una estrategia que emplean los organismos para contrarrestar el efecto tóxico de MP es el uso de MT que es una familia de proteínas de masa molecular pequeña, con alto porcentaje de cisteínas y una fuerte afinidad por los metales (Ureña, 2007).

En este trabajo, al exponer peces cebras adultos al agua del río Atoyac al 100 % de concentración se presentaron diferentes espectros de inducción de MT en branquias e hígado. La inducción de MT fue dependiente de la concentración de MP presentes en las distintas zonas de muestreo. Es importante mencionar que el espectro de metales que pueden unirse a las MT es bastante amplio. En condiciones fisiológicas las MT suelen coordinar zinc (Zn) y/o cobre (Cu). No obstante, si existen otros metales en el medio, como cadmio (Cd) o mercurio (Hg), que son tóxicos pueden desplazar a los anteriores (Harumi, 2007; Jia *et al.*, 2017; Mourgaud *et al.*, 2002). Los resultados del presente trabajo indican que la mayor concentración de MT se presentó en los tratamientos de la Z3 tanto en

branquia como en hígado (Figura 5). Estos resultados evidencian la enorme concentración de metales tóxicos vertidos en las localidades de SMA y VA, concretamente por las industrias del ramo textil y metálico que incluye talleres de herrería, así como medianas empresas del giro metalmeccánico, que vierten sus aguas residuales sin tratamiento terciario para eliminar los metales tóxicos (Caviedes *et al.*, 2015).

Se observó una mayor acumulación de MT en branquia con relación a hígado del 28 % (Figura 8), si bien el hígado es la glándula detoxificadora de mayor relevancia Jebali *et al.*, en 2008 demostró que dosis aguadas de MP superiores a 200 μgKg^{-1} reducen la síntesis de MT hepáticas debido a la inhibición progresiva de procesos metabólicos. Los resultados de la presente investigación no fueron consistentes con los reportados por García & Robles (1999) que determinaron que la mayor cantidad de proteínas ligadas al transporte de metales no funcionales se almacenan en las células hepáticas y renales. Gäel (2018) demostró una correlación positiva entre la concentración de Cd en hígado y la síntesis de proteínas quelantes en dos especies de peces: lobulina y lenguado, sin embargo, observó diferencias en la velocidad de absorción del metal en ambas especies, lo cual indica que los factores fisiológicos y la cinética de acumulación son características interespecíficas que afectan la variabilidad en las concentraciones de MT en distintas especies.

Sin embargo, Costa *et al.*, (2008) reportó que el deterioro del tejido hepático en peces del género *Sparus aurata* puede influenciar la disminución en la inducción de MT y bioacumulación de MP, esto puede explicar porque hubo organismos del grupo Z3 que presentaron disminuciones significativas en la concentración de MT con respecto a otros elementos del mismo grupo, ya que el tejido hepático de esos animales estaba sumamente dañado y no tuvieron capacidad de acumular mayor cantidad de metales. Por lo tanto, la integridad de los órganos son un factor que contribuye a variabilidad observada para la inducción de MT (Costa *et al.*; 2008).

Las branquias junto con el hígado son el principal órgano diana de toxicidad de los peces, sin embargo, a diferencia del tejido hepático están en contacto directo con el ambiente y son el lugar dominante de absorción de metales pesados (Evans, 1987). Son órganos sumamente complejos con una gran diversidad de células: respiratorias, mucosas, cloro y de pavimento, lo que hace complicado interpretar los mecanismos de inducción de MT en este órgano. En este estudio se observó la mayor presencia de MT en branquias en el grupo de la Z3 y el incremento de MT fue dependiente de la concentración de MP presentes en cada una de las zonas y está asociado con la función protectora del tejido contra la captación excesiva de MP.

Esta mayor tasa de síntesis de MT en el tejido branquial se puede deber de acuerdo con Dragun *et al.*, (2009) a una diversidad de células que actúan en mayor o menor medida en la detoxificación de MP por ser sitio principal de entrada de metales disueltos. El trabajo realizado por Alvarado *et al.*, (2006) apoya lo anterior ya que sus resultados mostraron que debido a exposiciones altas de MP las branquias de peces rodaballo tuvieron aumentos significativos y rápidos de células cloro, las cuales tienen un alto mecanismo de detoxificación intracelular que involucra la síntesis de altos niveles de MT citosólica. Otras investigaciones como las realizadas por Dang *et al.*, (2001) y Berntssen & Lundebye (2001) reportaron que el tipo de célula objetivo en la expresión de MT en branquias de tilapia y de salmón fueron células cloro y en menor medida las células del pavimento. Esta sería la

razón por la que en la presente investigación la acumulación de MT en el tejido branquial fue superior al del hepático.

El estrés oxidativo se puede definir como el exceso de productos oxidantes como los radicales libres que son sumamente tóxicos y pueden inducir daño acelerado a células, tejidos u órganos de un ser vivo. Tanto los mamíferos como los peces exhiben respuestas celulares muy similares ante el estrés oxidativo (Ochoa & González, 2008). Dentro de las principales lesiones relacionadas con el ataque de los radicales libres se encuentra la oxidación de membranas lipídicas, oxidación de proteínas y la oxidación a ácidos nucleicos (Vélez, 2015). El MDA es un metabolito resultante del proceso de peroxidación lipídica con vida media y alta reactividad que le permite actuar tanto en el interior como en el exterior de las células con la capacidad de inactivar enzimas, reaccionar con proteínas e interactuar con ADN (Ochoa & González 2008; Muñiz, 2014).

En este trabajo para evaluar el efecto prooxidante de la mezcla contaminante del agua del río Atoyac se analizaron las concentraciones en branquias e hígado de pez cebra de MDA como indicador de peroxidación lipídica y nitritos como metabolito indirecto de la producción de NO. Con respecto al MDA los resultados indican un aumento significativo de este parámetro tanto en branquias como en hígado en los grupos de las zonas 2 y 3 en relación con el grupo control y el grupo de la Z1 (Figura 6).

Lo anterior nos permite inferir que los altos niveles de MDA en los peces expuestos al agua de las zonas 2 y 3 indican que las células branquiales y hepáticas están en estado de estrés oxidativo lo que indica un alto riesgo de generar daño hepático y branquial lo cual se podría atribuir al efecto de las altas concentraciones de la mezcla contaminante de COV's y MP (Tablas 2 y 3). Al respecto existen varios estudios que se han llevado a cabo principalmente en modelos murinos en su mayoría, pero cuyos resultados concuerdan con el comportamiento observado en la presente investigación. Los resultados del presente trabajo concuerdan con los reportados por Saleh & Marie (2016) que utilizaron peces *Arius* para monitorear la contaminación en la Costa del Mar Rojo de la Republica de Yemen determinando MDA como biomarcador de estrés oxidativo el cual presento incrementos dependientes de la concentración de metales pesados en órganos vitales de los peces.

Compuestos como el benceno son altamente tóxicos y después de ser metabolizado genera radicales libres (Uzma *et al.*, 2010). Bahadar *et al.*, (2015) determinó que el benceno induce aumento significativo de ERO en glándulas digestivas como hígado y páncreas de biomodelos animales. Beddowes *et al.*, (2003) en su investigación menciona que compuestos como el cloroformo y tetracloruro de carbono tienen capacidad de inducir genotoxicidad por el agotamiento de glutatión a través de procesos de estrés oxidativo. Belmont *et al.*, (2010) en su investigación demostró que la mezcla compleja de tolueno, cloroformo y cloruro de metileno produce en sistemas biológicos estrés oxidativo.

Los efectos oxidantes de la exposición a MP han sido estudiados con mayor amplitud respecto a los COV's. Vargas *et al.*, (2007) y Berzosa (2011) indicaron en sus investigaciones que los metales pesados son buenos inductores de estrés oxidativo, participan en la generación de radicales como el OH- a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss. El ingreso de MP en los peces puede presentarse mediante su absorción a través de las branquias, tracto digestivo y la piel. Las branquias son la vía que tiene la mayor tasa de ingreso de MP y la piel representa el menor porcentaje de ingreso (Tomaila &

Iannacone 2018). Los resultados de esta investigación son similares a los reportados por Sai *et al.*, (2017) y Qing *et al.*, (2017); que expusieron especímenes de pez cebra a concentraciones ambientales relevantes de metales pesados como el Cd, reportando en sus resultados incrementos significativos de MDA en relación con su grupo control al aumentar las concentraciones de Cd en los grupos experimentales. Morcillo *et al.*, (2016) observó que las células de peces teleósteos expuestas a Pb, Hg, As, Cu y Zn mostraron aumentos significativos en los niveles de ERO que han sido aceptados como inductores principales de citotoxicidad. Valko *et al.*, (2005) demostró que la oxidación del As en condiciones fisiológicas da como resultado la formación de H₂O₂ lo que puede explicar los altos niveles de MDA en nuestros resultados.

Los radicales libres derivados del nitrógeno son moléculas sumamente reactivas que pueden producir daños irreversibles a las biomoléculas celulares. Al igual que los RLO los RLN son reconocidos por su acción deletérea dentro de las células. El radical libre derivado del nitrógeno que más atención ha tenido es el óxido nítrico (NO•) (Gutiérrez *et al.*, 2014). El NO• es un radical libre que tiene una vida muy corta de apenas 6 segundos, posee un electrón no apareado y se estabiliza al unirse con otras especies paramagnéticas como el oxígeno formando nitritos y nitratos (Benavides & Pinzón 2008). Debido a su corta vida y bajas concentraciones su cuantificación por medios biológicos es difícil de realizar, por eso se cuantifican sus metabolitos estables: nitrito (NO₂⁻) y nitrato (NO₃⁻). El NO• tiene efectos duales dependiendo de su concentración, a bajas concentraciones actúa como modulador neuronal y promueve neuro protección, pero en altas concentraciones puede producir toxicidad y degeneración tisular (Pulido, 2019).

Muy pocos estudios han abordado directamente la cuestión de la producción de ERO *in vivo*, ya sea en ausencia o presencia de xenobióticos, en organismos acuáticos, principalmente debido a las dificultades técnicas de tales mediciones, de ahí la importancia del presente trabajo. En la investigación, se expusieron peces cebra adultos a muestras de agua del río Atoyac concentradas el 100 % en volumen de 3 diferentes zonas para determinar su efecto nitrosativo en los órganos diana branquia e hígado para lo cual se valoró la concentración de (NO₂⁻) como metabolito indirecto de NO•. (Figura 7) muestran que el agua del río induce aumentos significativos de NO• tanto en branquias como en hígado en los tratamientos de las zonas 2 y 3 con relación al control.

Del mismo modo sucede con el estrés oxidativo el aumento de estrés nitrosativo muy probablemente se debe a las altas concentraciones de MP y COV's presentes en el agua del río que son fuente exógena de xenobióticos con la capacidad de inducir ERO y ERN. El estudio realizado por Badham & Winn (2010) demostraron que el benceno tiene una alta incidencia en la generación de ERO como los radicales superóxidos O₂⁻, hidroperóxidos e hidroxilos. Otras fuentes exógenas de ERO son los metales pesados como Cu, Co, Cr y Fe (Carvajal, 2019, Avello & Suwalsky 2006). Bajo estas condiciones se produce un aumento del radical O₂⁻ que al reaccionar con el radical NO• produce cantidades significativas de sustancias aún más oxidantes como el anión peroxinitrito (ONOO•), el cual ataca un gran número de blancos biológicos. Las ERN como el ONOO• alteran la estructura diversas biomoléculas como aminoácidos y proteínas a través de procesos de nitración.

Por lo que la relación entre NO• y el O₂⁻ es crítica en la etiología de enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Cárdenas *et al.*, 2006). Los resultados del presente proyecto

de investigación son similares a los reportados Pascoli *et al.*, (2011) determinaron que mezclas contaminantes constituidas por MP, sulfuros y ácidos volátiles presentes la Laguna de Venecia provocan en tejidos peces eventos estrés oxidativo y nitrosativo dependientes de la concentración contaminante. Por su parte Jensen (2009) sometió ejemplares de bagre rayado y peces de agua dulce, respectivamente a muestras de agua en condiciones ambientales las cuales indujeron hipercapnia (hipoxia) en los animales debido a las bajas cantidades de oxígeno disuelto en el agua lo que les indujo efectos de estrés nitro sativo que se vio reflejados en el incremento de los niveles de nitrito.

Finalmente podemos deducir con los resultados anteriores que el riesgo de daño celular en sistemas biológicos debido potencial prooxidante del agua del Río Atoyac es dependiente de la distribución espacial de las fuentes contaminantes que se van incrementando con relación a la cantidad y diversidad de actividades antrópicas que existen en las zonas de estudio y que de acuerdo al análisis de evaluación rápida de cuentas contaminantes de las zona de estudio (ERFCA) los MP y COV's son los agentes xenobióticos que tienen mayor impacto en la calidad del agua del río y su efecto toxicológico.

También se llevó a cabo la evaluación del efecto citotóxico del agua en las zonas de estudio con *Allium cepa*, demostró que hay una disminución gradual y significativa en el número y crecimiento de raíces dependiente de la concentración del agua en las zonas de estudio (Tabla 5 y figura 18 y 19). En las concentraciones del 25 y 50% de la Z3 se observó las afectaciones más severas sobre el desarrollo radicular de *A. cepa*, esto probablemente se debe a que las altas concentraciones de MP y COV's (Tablas 4 y 5) que tienen acción inhibitoria retardaron el proceso de la mitosis en la población celular de las raíces al inhibir la síntesis de ciclina B que activa a la enzima (quinasa dependiente de ciclina 1) Cdk1 para formar el factor promotor de mitosis (FPM) de manera que al disminuir este factor no se lleva a cabo la fosforilación de los filamentos en la envoltura nuclear, impidiendo que se rompa y que las células ingresen al estadio de profase (Tablas 7 y 8, Figura 20) retardando el crecimiento radicular (Sabeen, 2020; Timothy *et al.*, 2014; Beltrán & Gonza 2017).

Este comportamiento concuerda con los datos reportados por Debnath *et al.*, (2018) quien evaluó el efecto citotóxico de nanopartículas en el número de raíces de *A. cepa* y que después de 72 horas de exposición se observó que el mayor número de raíces se presentó en las concentraciones con menor cantidad de nanopartículas. En relación a la concentración del 100% en la zona 3, hubo completa inhibición en el desarrollo radicular (Tabla 5 y figura 18 y 19), este efecto podría ser resultado del total bloqueo de la síntesis de ciclina B que se encarga de llevar a cabo la inactivación de la proteína Rb que a su vez inactivaría a la proteína E2F que se encarga de promover a la célula a la etapa G1 en la interfase, de manera que las células se mantienen en quiescencia (Go) y no se puede iniciar el proceso del ciclo celular, este comportamiento podría deberse a las elevadas concentraciones de COV's y MP que rebasan los LMP de las NOMs y las normas internacionales en la Z3 (Rodríguez *et al.*, 2018; Cagri & ÇavuşoğluK, 2020). Esta inhibición en el desarrollo radicular observado en la presente investigación también fue similar a lo observado por Berrocal *et al.*, (2013), que determinó que a concentraciones por arriba de las recomendadas para su uso los biocidas vertimec y pentacloro inhiben el número de raíces en los bulbos de *A. cepa*.

Adicionalmente se presentó un efecto evidente en la concentración del agua al 100% en las zonas de estudio Z1 y Z2 en relación con el IM. En la zona 1 el porcentaje del IM e II son iguales con respecto al grupo control (Tabla 8) esto podría atribuirse a que la mayoría de los COV's y de los MP se encuentran dentro de LMP de las NOMs y las normas internacionales; sin embargo, para la Z2 el II fue mayor y el IM fue menor y significativo en relación al grupo control, lo que demuestra el mayor potencial citotóxico del agua en la zona 2, probablemente debido a la mayor proporción de MP y COV's, provenientes de las descargas de aguas residuales principalmente de tipo industrial. Los resultados de esta investigación concuerdan con los de otras investigaciones (Herrero *et al.*, 2012; Salazar & Quintero, 2020) que observaron decremento del IM dependiente del aumento de la dosis de sus tratamientos con respecto al tiempo por el incremento de nanopartículas y glifosato respectivamente, en el medio.

En relación con los índices de fase, el índice profásico (IP) en las 3 zonas se incrementó en la medida en que se incrementaba la concentración del agua en los tratamientos. Estos resultados demuestran la citotoxicidad producida por los MP y COV's que probablemente bloquean los complejos de Cdk y ciclinas A - B, que son los responsables de iniciar la condensación del material genético (Hepler & Hush, 1996). Los índices metafásicos (IMe), anafásico (IA) y telofásico (IT) en los tratamientos en la zona 1 no presentaron cambios significativos con respecto a su grupo control, situación que se evidencia al comparar el número y longitud de las raíces en las diferentes concentraciones, ya que no presentaron diferencias en comparación a su grupo control (Tabla 6).

En la Z2 el IMe en las concentraciones del 50 y 100% y el número de células en metafase fue menor y significativo en comparación a su grupo control y en los estadios de anafase (IA) y telofase (IT) el número de células fue semejante al grupo control, en términos del número de raíces no hubo diferencias en relación con el grupo control, pero la longitud fue menor en el grupo del 100% y significativa en relación con el control (Tabla 6). Esta disminución podría estar relacionada con las concentraciones de MP y COV's identificadas en la Z2, mismas que rebasaron los LMP de las NOMs (Tablas 4 y 5). También los trabajos reportados por Kumar *et al.*, (2015) observó la misma tendencia, al analizar la población celular de raíces de *A. cepa* sometidas a concentraciones progresivas de nanopartículas de óxido de cromo III y se presentó una disminución significativa, en los valores obtenidos en el IMe en comparación al grupo control.

En la Z3 el número de células en el estadio de metafase en la concentración al 50% fue menor y significativo en comparación a su grupo control, sin embargo, en los estadios de anafase (IA) y telofase (IT) el número de células no varió y fue semejante al grupo control (Tabla 8). En relación con el número de raíces y, su longitud fue menor y significativo al 50% y coinciden con los índices de fase evidenciando que a menor número de células en división mitótica la longitud de las raíces será menor y significativo (Tabla 3). Estos resultados coinciden con los obtenidos por (Andrioli & Mudry, 2011; Otiniana & Mura, 2014 y Kumar *et al.*, 2015).

La mayoría de los autores que han evaluado la contaminación la calidad del agua en el río Atoyac (Saldaña, 2006; Sandoval *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2019; Pérez *et al.*, 2019; Navarro *et al.*, 2017) coinciden que la causa principal de la contaminación es el factor

económico representado por el sector industrial, sin embargo, la problemática ambiental que existe en la cuenca hidrológica no es meramente ecológica, es multifactorial con repercusiones sociales, políticas y culturales que se interrelacionan y confluyen desencadenando conflictos socioambientales complejos (Gómez *et al.*, 2011).

La problemática de la contaminación ambiental en el Río Atoyac en San Martín Texmelucan y Tepetitla de Lardizábal en los últimos cuatro décadas se ha considerado un tema de preocupación social, ya que numerosos estudios han demostrado que la exposición a metales pesados y compuestos orgánicos volátiles se encuentra asociado al desordenado y desigual desarrollo industrial y poblacional que existe en la zona de estudio con impactos significativos en la salud de los ecosistemas y humana, y que pueden inducir enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos y alteraciones en el ADN como se ha evidenciado, en la presente investigación, que ocurre en *Danio rerio* y *A. cepa* (Raven *et al.*, 2014; Reece *et al.*, 2011; Carvajal, 2019, Avello & Suwalsky, 2006).

Las evidencias han revelado que, la zona de estudio cuenta con 448 industrias contaminando sus aguas que contiene compuestos con conocida actividad genotóxica, mutagénica y/o carcinogénica, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y sus derivados, los metales pesados, óxidos de azufre y de nitrógeno. Los efectos adversos observados de los MP y los COVs provienen de la inducción de estrés oxidativo en las células, que inicia con la formación de especies reactivas de oxígeno ERO, capaces de inducir cambios en ciclo redox celular y por tanto desencadenar una serie de eventos en cascada como la alteración del ciclo celular y daño oxidativo a macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en *A. cepa* y *Danio rerio* (Carvajal, 2019, Avello & Suwalsky, 2006; Livingstone, 2001):

Adicionalmente hay que destacar la permisibilidad de las autoridades competentes en la aplicación de las NOM, lo que contribuye de manera importante en la actual crisis ambiental que se vive SMT y TL y sin posibilidad de resolverse a mediano plazo, dado que existe un completo divorcio entre la salud ambiental y la pública que hacen que se desestimen las causas sociales y los procesos que generan enfermedades por la contaminación (Págan, 2016).

Finalmente, El crecimiento económico y la globalización en San Martín Texmelucan y Tepetitla de Lardizábal han originado evidentes beneficios, pero al mismo tiempo han generado dificultades e incertidumbres para identificar con exactitud la relación causal entre crecimiento industrial, poblacional y salud ambiental. La medición de la exposición a numerosos factores ambientales es compleja porque no se dispone de sistemas adecuados de información y vigilancia sanitaria que permitan valorar la magnitud y gravedad de los riesgos. Las evidencias de la investigación lo demuestran.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

La contaminación del río Atoyac en San Martín Texmelucan y Tepetitla de Lardizábal ha sido resultado de un intenso y generalizado desarrollo industrial y poblacional en la zona, lo que ha propiciado el vertido intensivo de 448 industrias que en su mayoría no son tratadas sus aguas residuales, previamente antes de ser vertidas al río Atoyac. Las evidencias indican que el agua del río Atoyac en las tres zonas de estudio contienen principalmente metales pesados, arsénico y compuestos orgánicos volátiles que en su mayoría sobrepasaron los LMP por las NOM, además, de que su efecto es carcinogénico, en la mayoría. La variedad de productos químicos industriales que están ingresando al medio acuático son absorbidos por los tejidos animales y vegetales. En el caso de *A. cepa* y *Danio rerio* los efectos del agua residual industrial se estudiaron en el sistema radicular, en branquia e hígado.

Los datos obtenidos en *A. cepa* indicaron que el crecimiento y desarrollo del organismo expuesto ha sido afectado por algún o varios componentes del agua el río, inhibiendo drásticamente el ciclo de la división celular. Las evidencias en los bioensayos con *Danio rerio* manifestaron que la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) estimuladas por los MP y los COV's presentes en el agua y el daño oxidativo resultante pueden ser un mecanismo de toxicidad en los organismos acuáticos expuestos a la contaminación y representan una amenaza para la salud ambiental del ecosistema y la salud humana.

Por lo anterior, la calidad del agua en el río Atoyac en la actualidad representa un alto riesgo ambiental que pudiera afectar no sólo al ambiente sino también a los sistemas biológicos tanto a nivel celular como molecular por los resultados de los bioensayos aplicados en los modelos experimentales *A. cepa* y *D. rerio*, que explican que estas mezclas contaminantes tienen un alto potencial toxico de inducir estrés oxidativo y alteraciones en el ciclo celular de los organismos sobre todo en la zona de estudio 3 que se identificó como punto crítico de la contaminación del río en la región. Estos resultados nos deben hacer reflexionar que es necesario aplicar la normatividad vigente en materia de descargas residuales, que la infraestructura para la protección del ambiente se debe desarrollar a la par del crecimiento urbano e industrial e incluir no sólo a los actores gubernamentales, también a las empresas para que cumplan con su responsabilidad en materia ambiental.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS

1. Abeera, S.; Mehwish, A.; Farhan, A.; Iqra, A.; Naeem, Rashid. 2022. Looking into a highly thermostable and efficient recombinant manganese-catalase from *Geobacillus thermopakistanensis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. VOL.133 No.1, 25-32.
2. Abrevaya, X. 2008. Genotóxicos o xenobióticos. Página Web IntraMed. Disponible en: <https://www.intramed.net/contenido.asp?contenido=47111>
3. AccesMedicina. 2020. Capítulo 40: Fisiología hepática. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1480§ionid=92816962#:~:text=Las%20venas%20centrales%20de%20los,a%20la%20vena%20cava%20inferior.>
4. Acevedo, J.J.; Ángeles, J.S.; Rivera, H.M.; Petricevich, L.; Nolasco, N.Y.; Collí, D.Y.; Olalla, J.S. 2013. Modelos in vitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. *Omnia Science*. 29-38. Disponible en <https://xdoc.mx/preview/capitulo-2-modelos-in-vitro-para-la-evaluacion-y-5e8ce3d37dfe8>
5. Acosta, M.B. 2021. Partes de la raíz y sus funciones. Página Web. Disponible en: <https://www.ecologiaverde.com/partes-de-la-raiz-y-sus-funciones-2777.html>
6. Acua, A.K. 2016. La percepción de riesgo entorno al río Atoyac en Puebla. (2012-2014). Tesis de licenciatura. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/bitstream/handle/20.500.12371/12817/28016TL.pdf?sequence=1>
7. Adarmes, J.P., Muller, A., Galleguillos, M. 2009. Determinación de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en el líquido sinovial de articulación metacarpofalángica equina. *Archivo Médico Veterinario*. 41, 255-259. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/amv/v41n3/art10.pdf>. Consultado 13 de mayo de 2020.
8. Aguilar, A.; Pérez, R.H. 2008. La contaminación agrícola del agua en México: retos y perspectivas. *Revista Latinoamericana de Economía*, (39):153, 1-11.
9. Alamgir Kabir; Hosney Jahan Sraboni, Md. Mahmudul Hasan, Raihan Sorker. 2022. Eco-environmental assessment of the Turag River in the megacity of Bangladesh. *Environmental Challenges*. 6 (2022) 100423
10. Alvarado, N.E.; Quesada, I.; Hylland, K.; Mari Gómez, I.; Soto, M. 2006. Quantitative changes in metallothionein expression in target cell-types in the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. *Aquatic Toxicology*, 77 (2006) 64–77
11. Amaral, A. F.; Alvarado, N.; Marigomez, I.; Cunha, R.; Hylland, K. & Soto, M. 2002. Autometallography and metallothionein immunohistochemistry in hepatocytes of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) after exposure to cadmium and depuration treatment. *Biomarkers*, 7:491-500,
12. Andrioli, N.; Mudry, M. 2011. Cytological and cytogenetic effects induced by thiabendazole on allium cepa root meristem. *Journal of basic and applied genetics*. (21):2, 12-23.
13. ANIPAC. Asociación Nacional de Industrias del Plástico, A.C. 2020. Tecnología del Plástico. Disponible en: <https://www.plastico.com/asociaciones/Anipac+3106775>

14. Apaza, L.Y. 2015. Nivel de conocimientos sobre la contaminación ambiental en los niños de 5 años de la I.E.I. N° 275 Llavini – Puno-2014”. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias de la Educación.
15. Arango, S.S. 2012. Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. Rev. Fac. Nac. Salud Pública 30:(1), 2-8.
16. Avello, M.; Suwalsky, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea, 494 segundo semestre.
17. Ayala, A. 2021. Atoyac, el río muerte: dos décadas de contaminación. Pie de página. Noticia digital. Recuperado de: <https://piedepagina.mx/atoyac-el-rio-muerte-dos-decadas-de-contaminacion/>
18. Ayuntamiento Constitucional del Municipio de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala. 2015. Plan Municipal de Desarrollo. Periódico Oficial No. 5, tercera Sección.
19. Baker, A.J.M. y P.L. Walker. 1989. Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. Chem. Special. Bioavailab. 1, 7-17.
20. Badham, H.J.; Winn, L.M. 2010. In utero and in vitro effects of benzene and its metabolites on erythroid differentiation and the role of reactive oxygen species. Toxicology and Applied Pharmacology, 244 (2010) 273–279.
21. Bahadar; H.; Maqbool, F.; Mostafalou. S.; Baeeri, M.; Abdollahi, M. 2015. Assessment of benzene induced oxidative impairment in rat isolated pancreatic islets and effect on insulin secretion. Environmental Toxicology and Pharmacology. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2015.04.010>
22. Beddowes, E.; Faux, S.P.; Chipman, J.K. 2003. Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress. Toxicology, 187, 101-115.
23. Belmont, E. M.; Lopez, A.; Serrano, L.; Martinez, A.; Montero, R.; Coballase, E.; Cardenas, N.; Huerta, B. 2010. Genotoxic damage, oxidative stress and xenobiotic metabolism changes produced by the exposure of the complex mixture of toluene, chloroform and methylene chloride. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Spain, Instituto Nacional de Pediatría, México D.F., México. Toxicology Letters, 196, 37–351.
24. Beltrán, R. A.; Gonza, K.A. 2017. Citotoxicidad y genotóxicidad de las aguas de los ríos Jequetepeque y Moche mediante el bioindicador ambiental *Vicia faba L.* Scientia Agropecuaria, 8 (3): 203 – 213. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v8n3/a03v8n3.pdf>
25. Benavides, María Carolina.; Pinzón, Alejandro. 2008. Óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. Rev. Col. Anest. 36: 45-52. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/rca/v36n1/v36n1a07.pdf>
26. Bernet, D.; Schmidt, H.; Meier, W.; Burkhardt, P.; Wahli, T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J Fish Dis 22:25–34.
27. Berntssen, M.; Lundebye, A.K. 2001. Energética en salmón del Atlántico (*Salmo salar L.*) para alimentado con cadmio dietético elevado. Bioquímica y Fisiología Comparadas Parte C: Toxicología y Farmacología. Volumen 128, número 3, marzo de 2001, páginas 311-323.

28. Berrocal, Alfredo.; Blas, Raúl.; Flores, Joel.; Siles, María.2013. Evaluación del potencial mutagénico de biocidas (vertimec y pentacloro) sobre cebolla. Revista colombiana de biotecnología, volumen 15, No. 1, páginas 17-27.
29. Berzosa, Cesar. 2011. Tesis de grado Estudio del daño oxidativo, niveles de defensa antioxidantes y efecto ergogénico de la matalotioneína en pruebas de esfuerzo físico agudo. Departamento de farmacología, Universidad de Zaragoza. Disponible en <https://zaguan.unizar.es/record/6810/files/TESIS-2012-002.pdf>
30. Bianchi, J.; Gaeta, E.L.; Marín, M.A. 2011. Déniz, F. 2010. Análisis estadístico de los parámetros DQO, DBO5 y SS de las aguas residuales urbanas en el ensuciamiento de las membranas de ósmosis inversa. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Ecotoxicology and Environmental Safety.
31. BID. Banco Interamericano de Desarrollo. 2013. Tratamientos de Aguas Residuales de México. Disponible en: <https://publications.iadb.org/publications/spanish/document/Tratamiento-de-aguas-residuales-en-M%C3%A9xico.pdf>. Consultado 28 de noviembre 2020.
32. Bonilla y Fernández, Ana Iris Ayala Osorio, Sarai González Contreras, Juana Deisy Santamaría Juárez, Sonia Emilia Silva Gómez. 2015. Calidad fisicoquímica del agua del distrito de riego 030 “Valsequillo” para riego agrícola. Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa ISSN 2007 – 8412.
33. Bravo, L. A.; Sánchez, J. J.; Izurieta, J. L.; Tomasini, A. C. 2015. Evaluación toxicológica del río Atoyac, Pue., y su relación con los parámetros fisicoquímicos. Asociación Mexicana de Ingeniería Ciencia y Gestión Ambiental, A.C. AMICA
34. Burgos, A., Cuevas, G., Carlón T., Ramírez, V., Tinoco, A., Solorio, G., S. Pérez Cortez. 2010. Determinación de cambios de uso del suelo como base del ordenamiento territorial de la Reserva de la Biosfera Zicuirán Infiernillo. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/272680148_Determinacion_de_cambios_de_uso_del_suelo_como_base_del_ordenamiento_territorial_de_la_Reserva_de_la_Biosfera_Zicuiran_Infiernillo/link/582c781308ae102f0729e9d2/download
35. Calva, L.G.; Torre, M.R. 2003. Metales pesados y sus efectos en organismos. Laboratorio de Ecosistemas Costeros, Depto. Hidrobiología. D.C.B.S. UA M-I. Contactos 51,33-42.
36. Çağrı, M.; ÇavuşoğluK., E. 2020. The Potential Risk Assessment of Phenoxyethanol with a Versatile Model System. Nature Research. 10:1209.
37. Cárdenas, N.; Chirino, Y.I.; Pedraza, J. 2006. El óxido nítrico y las especies reactivas de nitrógeno: aspectos básicos e importancia biológica. Profesores al día [Biomedicina], 17:(4), 443-451.
38. Caro-Borrero; Carmona-Jiménez; Rivera-Ramírez; Kaitlen Bieber. 2021. Los efectos de la urbanización en los ecosistemas acuáticos de las áreas protegidas periurbanas de la Ciudad de México: el discurso contradictorio de la conservación en medio de la expansión de los asentamientos informales. Política de uso de la tierra, Volumen 102, 105226.
39. Carvajal, C. 2019. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. Revista medicina legal de Costa Rica, Vol. 36 (1) 92-99.

40. Castro; Numa Pompilio, Calderón, Francisco.; Moreno, Rafael.; Tamariz, José Víctor.; Reyes, Erick. 2019. Nivel de contaminación de metales y arsénico en aguas residuales y suelos en la subcuenca del Alto Balsas en Tlaxcala y Puebla, México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 35 (2) 335-348.
41. Castro, N.P. 2017. Riesgo de contaminación de leche de vaca con metales pesados en los estados de Puebla y Tlaxcala, México. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba. Disponible en <https://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/15104>
42. Caviedes Rubio, D.I.; Muñoz Calderón, R.A.; Perdomo Gualtero, A.; Rodríguez Acosta, D.; Sandoval Rojas, I.J. 2015. Treatments for Removal of Heavy Metals Commonly Found in Industrial Wastewater. A Review. *Revista Ingeniería y Región.* 2015;13(1):73-90. Disponible en <https://journalusco.edu.co/index.php/iregion/article/view/710/1358>
43. Centeno, J.C. 2004. Población y medio ambiente. Red de Ecología Social. Disponible en: <https://ecologiasocial.com/2004/02/poblacion-y-medio-ambiente/>
44. Cerecedo, M.A. 2020. ríos contaminados: cáncer vs covid-19. UNESCO. Disponible en: <https://blogcatedraunesco.udlap.mx/rios-contaminados-cancer-vs-covid-19/>
45. Chamara P.; Koichi, Y. 2017. Impact of Population Growth on the Water Quality of Natural Water Bodies. *Sustainability*, 9, 1405; doi:10.3390/su908140
46. Chávez, L.N. 2015. Evaluación espacial y temporal del índice de calidad del agua del río Cazonen en Coatzintla, Veracruz. Tesis de grado, Universidad Veracruzana Facultad de ciencias biológicas y agropecuarias región Poza Rica, Tuxpan. Disponible en https://www.uv.mx/pozarica/mca/files/2019/05/G02_Luz-Nalleli-Chavez-Martinez.pdf
47. Chávez, N.C.; Méndez, N.; Uribe, M. 2020. Fisiología hepática. Access Medicina home page. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1480§ionid=92816962#:~:text=Las%20venas%20centrales%20de%20los,a%20la%20vena%20cava%20inferior.>
48. Chen, H. 2006. Recent advances in azo dye degrading enzyme research. *Current Protein and Peptide Science*, 7:(2) 101-111. DOI: 10.2174/138920306776359786
49. CONABIO. (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2022. Biodiversidad Mexicana. Ríos y Lagos. Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/ecosismex/rios-y-lagos>
50. CONAGUA. Estadísticas del Agua en México Comisión Nacional del Agua. 2018.
51. CONAGUA. Comisión Nacional del Agua. 2010. Estadísticas del Agua en la cuenca del río Balsas. Disponible en: http://centro.paot.org.mx/documentos/conagua/RIO_BALSAS_.pdf
52. CONAGUA. Comisión Nacional del Agua. 2011. Modificación al Decreto de Veda en la Cuenca del Río Balsas.
53. CONAGUA. Comisión Nacional del Agua. 2008. Evaluación del riesgo sanitario ambiental de las zonas aledañas al río Atoyac. Disponible en <https://docplayer.es/153350415-Evaluacion-del-riesgo-sanitario-ambiental-de-las-zonas-aledanas-al-rio-atoyac-resumen-ejecutivo.html>

54. CONAPO. Consejo Nacional de Población. 215. Indicadores Demográficos de México. Página Web. Disponible en: http://www.conapo.gob.mx/work/models/CONAPO/Mapa_Ind_Dem18/index_2.html
55. CONEVAL. Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social. 2020. Informe de pobreza y evaluación de Tlaxcala. Disponible en www.coneval.org.mx/coordinacion/entidades/Documents/Informes_de_pobreza_y_evaluacion_2020_Documentos/Informe_Tlaxcala_2020.pdf
56. Consejo Consultivo del Agua. 2018. Disponible en: <https://www.aguas.org.mx/sitio/index.php/panorama-del-agua/agua-en-mexico>. Consultado 28 de noviembre de 2020.
57. Contreras Pérez, J. 2004. Determinación de metales pesados en aguas y sedimentos del río Haina. *Cienc. Soc.*, 29(1): 38-71.
58. Cortés, J.H. 2021. Origen histórico de la contaminación hídrica y análisis jurídico del río Atoyac Historical origin of water pollution and legal analysis of the Atoyac River. *Tecnología y ciencias del agua*, ISSN 2007-2422, 12(1), 133-191, DOI: 10.24850/j-tyca
59. Cortijo, L.X. 2013. Evaluación de la citotoxicidad de una nueva diazocina en la Línea Celular LNCaP. Tesis Universidad Veracruzana, Instituto de Neuroetología.
60. Costa, P.M.; Repolho, T.; Caeiro, S.; Diniz, M. E.; Moura, I.; Costa, M. H. 2008. Modelado de la inducción de metalotioneína en el hígado de *Sparus aurata* expuesto a sedimentos contaminados con metales. *Ecotoxicología y Seguridad Ambiental*, Volumen 71, número 1, páginas 117-124
61. Dang, Z.C.; Berntssen, M.; Lundebye, A.K.; Flik, G.; Wendelaar Bonga; S.E.; Lock; A.C. 2001. Expresión del receptor de metalotioneína y cortisol en branquias de salmón del Atlántico, *Salmo salar*, expuesto a cadmio en la dieta. *Toxicología acuática*, Volumen 53, número 2, páginas 91-101
62. De Buen, R.C. 2007. Tesis de licenciatura. modelación de la dispersión de los contaminantes vertidos en playa norte, Veracruz. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias.
63. Debnath, P., Mondal, P.; Hajra, A.; Das, C. 2018. Cytogenetic effects of silver and gold nanoparticles on *Allium cepa* roots. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.
64. Déniz, F. 2010. Análisis estadístico de los parámetros DQO, DBO₅ y SS de las aguas residuales urbanas en el ensuciamiento de las membranas de ósmosis inversa. Tesis Doctoral. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
65. Díaz, G. A. 2018. Guía para las empresas con exposición a riesgo biológico. Mini trabajo. Disponible en: <https://www.mintrabajo.gov.co/documents/20147/59676/GUIA+RIESGO+BIOL%20%93GICO+EMPRESAS.pdf/d37bb562-af8e-a51b-106e-60c7784f645b>
66. Di Liu, M.W., Tian, T., Wang, X.J., Kang, H.F., Jin, T.B., Zhang, S.Q., Guan, H.T., Yang, P.T., Liu, K., Liu, X.H., Xu, P., 2017. Genetic polymorphisms in metallothionein 2A increase breast cancer risk in Chinese Han population. *Aging (Albany NY)*. 9:(2), 547.
67. Dimuthu, W.; Wadasinghe, L.G.Y.J.G. 2019. Bioensayo de *Allium cepa* para evaluar la citotoxicidad del agua y los sedimentos en una corriente tropical sujeta a

- contaminantes de múltiples fuentes puntuales y difusas. *Revista de Toxicología*. <https://doi.org/10.1155/2019/5420124>
68. Ding, Q.; Li, Y.; Liu J.; Ran, C. 2021. Propionate induces intestinal oxidative stress via SOD2 propionylation in zebrafish. *Science Cell Press*.
 69. Doménech, J. 2003. Medio ambiente y sus efectos sobre la salud. La oficina de farmacia y la información sanitario-ambiental. *Sanidad Ambiental*, 1-6.
 70. Domínguez, M.C. 2015. La contaminación ambiental, un tema con compromiso social. *Revista Producción + Limpia*, 10 (1). Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-04552015000100001
 71. Donato, M.T.; Castell, J.V.; Gómez, M.J. 1995. A specific microassay for evaluating hepatic LDH activity in co-cultures of hepatocytes with other cells. *Cytotechnology* 17: 45-52.
 72. Dragun, Z; Podrug, M; Biserka Raspor.2009. The assessment of natural causes of metallothionein variability in the gills of European chub (*Squalius cephalus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 150, 209–217
 73. Durand, L. 2014. ¿Todos ganan? Neoliberalismo, naturaleza y conservación en México. *Sociológica*, 29(82): 183-223.
 74. Estrada-Rivera, A.; Díaz Fonseca, A.; Treviño Mora, S.; García Suastegui, W.A.; Chávez Bravo, E.; Castelán Vega, R.; Morán Perales, J.L.; Handal-Silva, A. 2022. The Impact of Urbanization on Water Quality: Case Study on the Alto Atoyac Basin in Puebla, Mexico. *Sustainability* 2022, 14, 667. <https://doi.org/10.3390/su14020667>
 75. Estrada Rivera, A.; Wendy A. García, Edith Chávez, Rosalía Castelán, María T. Zayas, Samuel Treviño, Alfonso Díaz y Anabella Handal Silva. 2022. Mixture of Toxic Metals and Volatile Organic Compounds in a River Induces Cytotoxicity. *Journal of Chemistry*. Hindawi. Volume 2022, Article ID 1285826, 9 pages, <https://doi.org/10.1155/2022/1285826>
 76. Ekwall, B. 1995. The basal cytotoxicity concepts. In: A. Goldberg and L. Zutphen, Eds. *Alternative Methods in Toxicology*. Vol. II: pp 721-725.
 77. EPA. Environmental Protection Agency. 2020. Efectos en la salud por la exposición al mercurio. Disponible en <https://espanol.epa.gov/espanol/efectos-en-la-salud-por-la-exposicion-al-mercurio>
 78. Encalada, A. 2017. Funciones ecosistémicas y diversidad de los ríos. Reflexiones sobre el concepto de caudal ecológico y su aplicación en el Ecuador. Laboratorio de Ecología Acuática. Colegio de Ciencias Biológicas. Universidad San Francisco de Quito. Disponible en: <https://agua.org.mx/wp-content/uploads/2017/06/Funciones-ecosist%C3%A9micas-y-diversidad-de-los-r%C3%ADos.-Reflexiones-sobre-el-concepto-de-caudal-ecol%C3%B3gico-y-su-aplicaci%C3%B3n-en-el-Ecuador.pdf>
 79. Escobar, Natalia. 2003. Tesis de grado Análisis de compuestos orgánicos volátiles en agua potable por cromatografía de gases. Facultad de Ingeniería, Universidad de los Andes. Disponible en <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/10178/u245506.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 80. EUROLAB, Laboratory Services. 2017. Pruebas de citotoxicidad. Recuperado de <https://www.eurolab.com.tr/es/testler/medikal-tibbi-cihaz-performans->

- <https://www.tribunadelinvestigador.com/ediciones/2016/1/art-18/> Consultado 10 de mayo de 2020.
96. Gil, F. 2000. El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. *Revista de Toxicología*. 17: 19-26.
 97. Gobierno Municipal Tepetitla de Lardizábal. 2017. Periódico Oficial No. 20 segunda Sección, mayo 17 del 2017. Disponible en <https://www.efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://periodico.tlaxcala.gob.mx/indices/Peri20-2a2017.pdf>
 98. Gómez, C.S.; Barrón; K.S.; Moreno, L. 2011. Crecimiento económico y medio ambiente en México. *El trimestre económico*, vol. LXXVIII (3), núm. 311, julio-septiembre de 2011, pp. 547-582
 99. González, I. 2019. Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante en el paciente con hipertrofia cardiaca: estudio observacional. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de medicina.
 100. González, Acolt, Roberto, González Guillen, Manuel de Jesús. 2010. Efectos de la Política Comercial en los Recursos Naturales y el Ambiente. *Revista. Internacional. Contaminación. Ambiental*. 26 (3) 229-251, 2010. Disponible en: www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992010000200006 Consultado: 28 de agosto de 2019.
 101. Gordillo Martínez, Alberto, Cabrera Cruz, René, Hernández Mariano, Marisol, Galindo, Erick, Otazo, Elea, Prieto Francisco. 2010. Evaluación Regional del Impacto Antropogénico sobre el aire, agua y suelo. Caso: Huasteca Hidalguense, México. *Revista. Internacional Contaminación Ambiental*. 26(1); 5-16. Disponible en: www.scielo.org.mx/pdf/rica/v26n3/v26n3a6.pdf. Consultado: 28 de agosto de 2019.
 102. Grandjean, P. 2000. Biomarkers in Epidemiology. *Clinical. Chemistry*. 41:(12), 1800-1803.
 103. Greenpeace. 2013. Ríos Tóxicos Lerma y Atoyac. Pág. 6. Disponible en: https://agua.org.mx/wp-content/uploads/2018/02/Rios-toxicos-Lerma-y-Atoyac_Greenpeace.pdf
 104. Greenpeace. 2012. Ríos Tóxicos en México, 1-8. Disponible en: https://www.greenpeace.org/static/planet4-mexico-stateless/2018/11/93c3b859-93c3b859-rios_toxicos.pdf
 105. Gutiérrez, J.; López, A. 2001. Fundamentos de ciencia toxicológica. *Días de Santos*. 1-26. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/80481737/Ciencia-Toxicologia>.
 106. Gutiérrez-Salinas, José; Mondragón-Terán, Paul; García-Ortiz, Liliana; Hernández-Rodríguez, Sergio; Ramírez-García, Sotero; Núñez-Ramos, Norma R. 2014. Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, vol. 19, núm. 4, octubre-diciembre, 446-454
 107. Gutiérrez, M. E.; García, M. 2010. San Martín: un lugar mágico (en línea). Disponible en <http://sanmartintexmelucan.blogspot.com/>
 108. Hae Jong Yang, Hyo Jin Jeong, Ki Moon Bong, Dal Rae Jin, Tae-Woo Kang, Hui-Seong Ryu, Jong Hak Han, Won Jun Yang, Heejung Jung, Soon Hong Hwang, Eun Hye Na. 2020. Materia orgánica y metales pesados en sedimentos fluviales de la

- costa suroeste de Corea: distribuciones espaciales, contaminación y evaluación de riesgos ecológicos. *Boletín de Contaminación Marina*. Vol. 159.
109. Haro-García, Luis Cuauhtémoc; González-Bonilla, César Raúl; Chacón-Salinas, Rommel; Pérez-Lucio, Carlos; Juárez-Pérez, Cuauhtémoc Arturo; Borja-Aburto, Víctor Hugo. 2008. Exposición ocupacional a mezcla de benceno-tolueno-xileno. Manifestaciones hematoinmunológicas, *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 46:(6), 643-650.
 110. Harumi, E. S. 2007. Las metalotioneinas y el estrés quirúrgico. *REB* 26(2): 67-72, Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2007/02/g_Metalotioneinas.pdf
 111. Hepler, P.K.; Hush, J. M. 1996. Behavior of Microtubules in Living Plant Cells. *Plant Physiol.* 11 2: 455-461
 112. Hernández, M.L. 2021. La contaminación del río Atoyac y sus efectos socioambientales en San Mateo Ayecac, Tlaxcala. *Río Atoyac: Hacia una gestión integral de una problemática multifactorial*. Primera edición. El Colegio de Tlaxcala, A. C.
 113. Hernández, T. 2017. Transformaciones socioeconómicas territoriales en el municipio de San Martín Texmelucan, México 1980-2010. *Nova Scientia*. Disponible en: [2007-0705-ns-9-18-00437.pdf](https://doi.org/10.21973/2007-0705-ns-9-18-00437) (scielo.org.mx).
 114. Hernández, A.G. 2016. Estudio de la procedencia de contaminantes en el río Atoyac a través del monitoreo del tiempo real 2016 Puebla, México. Tesis Instituto Politécnico Nacional Secretaria de Investigación y Posgrado. Centro Interdisciplinario de Investigación y Estudios Sobre Medio Ambiente y Desarrollo.
 115. Hernández, S.; Gutierrez, J.; García, L.; Mondragón, P.; Ramírez, S.; Núñez, N.R. 2014. Estrés oxidativo y nitrosativo como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol. *Medicina Internacional México*, 30:295-308.
 116. Herrero, O.; J.M. Pérez Martín, P.; Fernández Freire, L.; Carvajal López, A.; Peropadre, M.J. Hazen. 2012. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 743: 20-24.
 117. Hsiang-Chieh Chuanga, De-Sing Dingb, Chih-Hsuan Fana, Chia-Hua Linb, Chiu-Min Chenga. 2021. Effect of cell-permeable grouper Manganese Superoxide Dismutase on environmental stress in fish. *Protein Expression and Purification*. 187(2021)105951
 118. Hua-peng Qin.; Qiong Su.; Soon-Thiam Khu.; Nv Tang. 2016. Water Quality Changes during Rapid Urbanization in the Shenzhen River Catchment: An Integrated View of Socio-Economic and Infrastructure Development. *Sustainability*, 6, 7433-7451; doi:10.3390/su6107433.
 119. Imoto, D., Saito, N., Nakajima, A., Honda, G., Ishida, M., Sugita, T., Ishihara, S., Katagiri, K., Okimura, C., Iwadate, Y., & Sawai, S. (2021). Comparative mapping of crawling-cell morphodynamics in deep learning-based feature space. *PLOS Computational Biology*, 17(8), e1009237. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009237>

120. INAFED. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Sistema Nacional de Información Municipal. 2010. <http://www.snim.rami.gob.mx/>
121. IPCC. 2014. Impactos, adaptación y vulnerabilidad Contribución del Grupo de trabajo II al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático.
122. INEGI. Instituto Nacional de Geografía e Informática. 2020. Censos de Población y vivienda (en línea). Disponible en <https://www.inegi.org.mx/programas/ccpv/2020/>
123. INEGI. Instituto Nacional de Geografía e Informática. 2019. Informe técnico de la cuenca hidrológica río Alto Atoyac Humedales.
124. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Directorio Estadístico Nacional de Unidades Económicas 2020, Datos a noviembre de 2020. Available online: <https://www.inegi.org.mx/rnm/index.php/catalog/587>
125. Ibararán, M.E.; Mendoza, A.; Pastrana, C.; Manzanilla, E.J. 2017. Determinantes socioeconómicos de la calidad del agua superficial en México. *Región y sociedad / año XXIX / no. 69*.
126. Iqbal, M. 2016. *Vicia faba* bioassay for environmental toxicity monitoring: A review. *Chemosphere*. 144(2016): 785-802.
127. Izurieta, J. Qué es la contaminación de los ríos (en línea). 2012. Disponible en: guasimple.org.mx/revistav3/index.php?option=com_content&view=article&id=220:ique-es-la-contaminacion-de-los-rios&catid=33:notas-de-agua-v3. (Consultado 5 de noviembre de 2018).
128. Jebali, J.; Banni, M.; Gerbej, H.; Boussetta, H.; López Barea, J.; Alhama, J. 2008. Metallothionein induction by Cu, Cd and Hg in *Dicentrarchus labrax* liver: Assessment by RP-HPLC with fluorescence detection and spectrophotometry. *Marine Environmental Research*, 65 (2008) 358–363.
129. Jensen, Frank B. 2009. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: A comparative perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1787 (2009) 841–848.
130. Jerman, Stephanie; Sun, Zhaoxia. 2017. Chapter Two - Using Zebrafish to Study Kidney Development and Disease. *Current Topics of Biology*. 41-79. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.11.008>
131. Jia, L., Sai, N.; Shuang, Y.; Hu, X.; Qing, L. 2017. Preheating mitigates cadmium toxicity in zebrafish livers: Evidence from promoter demethylation, gene transcription to biochemical levels. *Aquatic Toxicology*. 190. 104-111. Disponible en: <https://www.proxydgb.buap.mx:2128/science/article/pii/S0166445X17301765#> Consultado 11 de mayo de 2020.
132. Jovanović, D., Marković, R., Radulović, S., Grdović, S., Krstić, M., Šefer, D. 2018. Aflatoxins in feed. *Veterinarski Glasnik*, 72 (1), 14-21.
133. Juárez, M.F. 2016. Contaminación del río Atoyac. Infografías animadas. Universidad Iberoamericana Puebla. Repositorio Institucional.
134. Juárez. D.; Méndez, M. 2014. Aspectos funcionales de la metalotioneínas en el sistema nervioso central. *Arch Neurocién (Mex)*. 19:(1), 34-41. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/arcneu/ane-2014/ane141f.pdf>. Consultado 02 de diciembre de 2020.

135. Kamala, H.M.; EL Sayeda, W.M.; Ibrahemb, H.M.; EL Sokaryc, M.A.; Behirya, E.G. 2020. Study of metallothionein-2A mRNA relative expression and oxidant status in females with breast cancer. *Meta Gene*.
136. Kamel, Margrit; Ninov, Nikolay. 2017. Catching new targets in metabolic disease with a zebrafish. *Current opinion in pharmacology*. 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.08.007>
137. Kieffer, M. 2014. Análisis de las condiciones de un territorio para la integración del turismo rural comunitario: una aproximación a la investigación en el Bajo Balsas, Michoacán. Tesis de grado de doctorado.
138. Kost, B.J. 1999. Cytoskeleton in plant development. *Curr. Opin. Plant Biology*. 2, 462-470.
139. Kumar, D., Rajeshwari, A.; Singh, P. Chaudhuri, G.; Mukherjee, A.; Chandrasekara, N.; Mukherjee, A. 2015. Cytogenetic studies of chromium (III) oxide nanoparticles on 2 *Allium cepa* root tip cells. *ScienceDirect*.
140. La Jornada. 2020. Infiernos Ambientales, la cloaca de la civilización. Suplemento informativo la jornada. Número 158. Disponible en <https://www.jornada.com.mx/2020/11/21/delcampo/delcampo158.pdf>
141. Li, L.; Fu, M.; Yang, D.; Tu, Y.; Yang, J. 2022. Sensitive detection of glutathione through inhibiting quenching of copper nanoclusters fluorescence. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*.
142. Livingstone D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 2001, 42: 656-666.
143. Lopez, E.M.; Garcia, B.N.; Larroudé, V.; Picicelli, R.; Reynosov, C.Y.; Ramírez, E. 2016. Uso de *Allium cepa* test como indicador de eficacia para el tratamiento de efluentes. *Ciencia y Tecnología*, No. 16, 81-89.
144. López, M.M.; Portmann, E.; Angeleri, G.; Gurni, A.; Caraballo, M. 2009. Biomarcadores para evaluación de genotoxicidad potencial. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (2), 154 – 159.
145. Luderman, Lauryn; Unlu, Gokhan. 2017. Chapter Three - Zebrafish Developmental Models of Skeletal Diseases. *Current Topics og Biology*. 81-24. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.11.004>
146. Lyons, B. P.; Stentiford, G. D.; Bignell, J.; Goodsir, F.; Sivyer, D. B.; Devlin, M.; Lowe, D.; Beesley, A.; Pascoe, C. K.; Moore, M. N. & Garnacho, E. A biological effects monitoring survey of Cardigan Bay using flatfish histopathology, cellular biomarkers and sediment bioassays: Findings of the Prince Madog Prize 2003. *Environmental Research*, 62: S342-6,
147. Maja, J.C.; López, Núria.; De Castro, H.; Petrović, M.; Muñoz, I.; Ginebreda, A.; Barceló, D. 2016. Evaluación del riesgo ecotoxicológico de la contaminación química en cuatro cuencas hidrográficas ibéricas y su relación con el estado de las comunidades de macroinvertebrados acuáticos. Vol. 540, 324-33.
148. Maldonado, O.; Jiménez, E.N.; Guapillo, M.R.; Ceballos, G.M.; Méndez, E. 2010. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica UV*, 32-39. Disponible en https://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol10_num2/articulos/radicales.pdf

149. Mancilla, Ó.R.; Ortega, H. M.; Ramírez, C.; Uscanga, E.; Ramos, R.; Reyes, A. 2012. Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México. *Rev. Int. Contam. Ambiental.* 28 (1) 39-48.
150. Martínez, E.; Rodríguez, P.F.; Shruti, V.C.; Sujitha, S.; Morales, S.; Muñoz N. 2017. Monitoring the seasonal dynamics of physicochemical parameters from Atoyac River basin (Puebla). Central Mexico: multivariate approach. *Environmental Earth Science*, 76-95.
151. McDonald, B.C.; Joost A. de Gouw.; Jessica B. Gilman.; Shantanu H. Jathar.; Ali Akherati.; Christopher D. Cappa.; Jose L. Jimenez.; Julia Lee-Taylor.; Patrick L. Hayes.; Stuart A. McKeen.; Yu Yan Cui.; Si-Wan Kim.; Drew R. Gentner.; Gabriel Isaacman-VanWertz.; Allen H. Goldstein.; Robert A. Harley.; Gregory J. Frost.; James M. Roberts.; Thomas B. Ryerson.; Michael Traine. 2018. Volatile chemical products emerging as largest petrochemical source of urban organic emissions. *Atmospheric Chemistry.* 359, 760–764.
152. McNair, H.M. 1993. *LC–GC International*, 6, 740.
153. Milena, C.; Cortés, A.C.; Mercedes, D.; Groot, H. 2005. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica* 25: 335-345.
154. Montero, R.D.; López, R.; Méndez, A.; Galicia, I.; García, G.; Serrano, L. 2020. Aumento de frecuencias de micronúcleos en reticulocitos de niños expuestos a contaminación industrial: estrés oxidativo y polimorfismo OGG1 S326C. *Investigación de mutaciones/toxicología genética y mutagénesis ambiental Vol. 853*
155. Montero, R.; Serrano, L.; Araujo, A.; Dávila, V.; Ponce, J.; Camacho, R.; Morales, E.; Méndez, A. 2006. Increased cytogenetic damage in a zone in transition from agricultural to industrial use: Comprehensive analysis of the micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 21, 335–342. Available online: <https://academic.oup.com/mutage/article/21/5/335/1137853>
156. Morais, D.; Marin, M.A. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 682 (2009) 71–81.
157. Morales, E. 2004 “Conclusiones”, Eduardo Morales Sierra (coord.), *Ambiente y derechos humanos*, Centro “Fray Julián Garcés”, Tlaxcala: 79-81.
158. Mora, M. 2021. Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Maestría en Enseñanza de las Ciencias Exactas y Naturales.
159. Morales Carrillo, M.Y. 2021. Los servicios ecosistémicos en ríos urbanos, el canal san Antonio en Bogotá como estrategia de aula ambiental para estudiantes de secundaria. Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Maestría en Enseñanza de las Ciencias Exactas y Naturales.
160. Morales, J.A.; Rodríguez, L.; Torres, F. 2021. Modelo de contaminación del río Atoyac e incidencia de enfermedades en la región Puebla-Tlaxcala. Área de Crecimiento y Medio Ambiente, Departamento de Economía, Universidad Autónoma Metropolitana UAM, Unidad Azcapotzalco.
161. Morales, J.A.; Rodríguez, L.; Torres, F. 2005. Modelo de contaminación del río Atoyac e incidencia de enfermedades en la región Puebla-Tlaxcala. Área de

- Crecimiento y Medio Ambiente, Departamento de Economía, Universidad Autónoma Metropolitana UAM, Unidad Azcapotzalco.
162. Morcillo, P.; Esteban, M.A.; Cuesta, A. 2016. Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line. *Chemosphere*, 144: 225-233
 163. Moreno, Mirella. (2013). Mantenimiento en el laboratorio del pez cebrá. Facultad de Ciencia y Tecnología. pág. 4 Disponible en: <https://addi.ehu.es/bitstream/10810/10642/1/TFG.%20Pez%20cebra.docx.pdf>
 164. Mourgau, Y., E. Martinez, A. Geffard, B. Andral, JY Stanisiere y JC Amiard. 2002. Concentración de matalotioneína en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* como biomarcador de respuesta a la contaminación por metales: validación en campo. *Los biomarcadores 7*: 479-490.
 165. Muoi, L.V.; Srilert, C.; Dang, V.P.; Phan, T. 2022. Spatial and temporal variabilities of surface water and sediment pollution at the main tidal-influenced river in Ca Mau Peninsular, Vietnamese Mekong Delta. *Journal of Hydrology: Regional Studies*. 41 101082.
 166. Muñoz, P. 2014. Estrés oxidativo y daño vascular en procesos de hipoxia. malondialdehído (MDA) como biomarcador de daño oxidativo. *Revista Electrónica Biomédica*, 4(2): 46-49. Disponible en: <https://biomed.uninet.edu/2014/n2/muniz.html>. Consultado 2 de mayo de 2020.
 167. Muñoz, D.M.; Guerreo, S.N. 2013. *Allium* test para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de extractos naturales en células meristemáticas de *Allium cepa*. *Desarrollo Humano*, 11(19) 83-86.
 168. Navarro, Mina Lorena; Fini, Daniele; Castro, Diego. 2017. Neoliberalismo y urbanización en la ciudad de Puebla: dinámicas y efectos. *Bajo el Volcán*, 17:(7), 67-90.
 169. Naturam, S. 2016. Conservación del hábitat de la guacamaya verde en el Alto Balsas. Reporte final, Programa de Conservación de Especies en Riesgo. México D.F.: CONANP, SEMARNAT.
 170. NMX-AA-051-SCFI-2006. Residuos – determinación de compuestos orgánicos volátiles por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas en productos de extracción de constituyentes tóxicos (pect) – método de prueba.
 171. NOM-001-SEMARNAT-2021. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales; DOF, México, 1997.
 172. Ochoa, D.M.; González, J.F. 2008. estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 55:115-126. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4076/407639218006.pdf>
 173. Olvera, M.A.E. 2017. La lucha por la recuperación ambiental del Río Atoyac: una puerta de esperanza. *La Jornada del Campo*. Número 16. Disponible en: <https://www.jornada.com.mx/2017/05/20/cam-lucha.html>
 174. OMS. Organización Mundial de la Salud. 2015. Connecting Global Priorities: Biodiversity and Human Health. A State of Knowledge Review. Ginebra.
 175. ONU. Naciones Unidas. 2019. Noticias ONU. <https://news.un.org/es/story/2019/03/1452781>

176. Ospina, O.; García, G.; Gordillo, J.; Tovar, K. 2015. Evaluación de la turbiedad y la conductividad ocurrida en temporada seca y de lluvia en el río Combeima (Ibagué, Colombia). *Investigación. Ingeniería Solidaria*, 12(19).
177. Ostrea, E.; Cepeda, E.; Balun, J. 1985. Red Cell Membrane Lipid Peroxidation and Hemolysis Secondary to Phototherapy. *Acta Pediátrica*, 74(3): 378-381. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1651-2227.1985.tb10987.x>. Consultado 10 de mayo de 2020.
178. Ostrosky, P. 1993. El índice mitótico y la cinética de proliferación linfocitaria en el monitoreo biológico. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Consultado en: http://www.anmm.org.mx/bgmm/1864_2007/1994-130-6-432-437.pdf
179. Otiniana, A.; Muro, J.C. 2014. Efecto de tres concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Citrus limón* sobre el ciclo celular de meristemos radiculares de *A. Cepa*. Tesis Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Ciencias Biológicas.
180. Pabón, R. Benítez, Sarria-Villa, J. A. Gallo. 2020. Contaminación del agua por metales pesados, métodos de análisis y tecnologías de remoción. Una revisión. *Entre Ciencia e Ingeniería*, vol. 14, no. 27, páginas 9-18.
181. Pagán, R.H. 2016. El río Atoyac, riesgo ecológico o atentado a la salud. La Jornada de Oriente. Página Web.
182. Pascoli, Francesco.; Negratoa, Elena.; Di Giancamillo, Alessia.; Bertottoa, Daniela.; Domeneghini, Cinzia. 2011. Evaluation of oxidative stress biomarkers in *Zosterisessor ophiocephalus* from the Venice Lagoon, Italy. *Aquatic Toxicology*, 101 (2011) 512–520.
183. Peña, C. 2004. Toxicología Ambiental. Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. Consultado en: <http://www.bvsde.paho.org/tutorial/fulltex/toxamb.pdf>
184. Pérez Castresana, Gabriela; Tamariz Flores, Víctor; López Reyes, Lucía; Hernández, Aldana; Fernando; Rosalía Castelán Vega, Rosalía; Morán Perales, José L; García Suastegui, Wendy A; Díaz Fonseca, Alfonso; Handal Silva, Anabella. 2018. Atoyac River Pollution in the Metropolitan Area of Puebla, México. *Water*. Págs. 1-17.
185. Pérez, G.; Castañeda, E.; García, W.; Morán, J.L.; Cruz, A.; Handal, A. 2019. Evaluation of Health Risks Due to Heavy in a Rural Population Exposed to Atoyac River Pollution in Puebla, Mexico. *Water MDPI*, 11(2) 277. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4441/11/2/277>.
186. Pichardo, R. 2021. La cuenca Atoyac ha llegado a su límite ambiental: investigadores. *Noticia Digital. IBERO, Puebla*.
187. Plan Municipal de Desarrollo 2014-2016. H. Ayuntamiento Constitucional del Municipio de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala. *Periódico Oficial No. 5 tercera Sección*.
188. Polo, Carlos. 2019. *Revistas Académicas Ciencias*. Metales pesados: fuentes y su toxicidad sobre la salud humana. Disponible en: <http://revistas.unjbg.edu.pe/index.php/cs/article/view/842>. Consultado: 1 de febrero de 2020.
189. Prieto Méndez, J.; González Ramírez, C.A.; Román Gutiérrez, A.D.; Prieto García, F. 2009. Plant contamination and phytotoxicity due to heavy metals from soil and water. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10 (2009): 29 - 44

190. Pulido, M.G. 2019. Evaluación de la respuesta oxidante en hipocampo de ratas administradas con cadmio. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas en el área de Bioquímica y Biología Molecular.
191. Qian, Shenhua.; Qin, Danya.; Wu, Xue.; Hu, Siwei.; Hu, Linyu.; Lin, Dunmei.; Zhao, Liang.; Shang, Kankan.; Song, Kun.; Yang, Yongchuan. 2021. Urban growth and topographical factors shape patterns of spontaneous plant community diversity in a mountainous city in southwest China. *Urban Forestry & Urban Greening*, 55 (2020) 126814.
192. Qing-Ling Zhu; Sai-Nan Guo; Shuang-Shuang Yuan; Zhen-Ming Lv; Jia-Lang Zheng; Hu Xia. 2017. Los indicadores de calor del estrés oxidativo, la inflamación y el transporte de metales muestran una dependencia del historial de contaminación por cadmio en el hígado de las hembras del pez cebra. *Toxicología acuática*. Volumen 191, páginas 1-9.
193. Qin, Yan.; Yang, Zhifeng.; Yang, Wei. 2014. Valoración de la pérdida de servicios ecosistémicos relacionados con las plantas causada por el estrés hídrico en el humedal del delta del río Amarillo de China. *Acta Ecológica Síntica*. Volumen 34, número 2, páginas 98-105.
194. Rahman, k.; Barua, S.; Imran, H.M. 2021. Assessment of water quality and apportionment of pollution sources of an urban lake using multivariate statistical analysis. *Cleaner Engineering and Technology*.
195. Ramos, L.M.; Vidal, L.A.; Vilardy, S. Saavedra, L. 2008. Análisis de la contaminación microbiológica (coliformes totales y fecales) en la bahía de santa Marta, Caribe colombiano. *Acta Biol. Colomb.*, 13(3), 87 – 98.
196. Raven, P. H., Johnson, G. B., Mason, K. A., Losos, J. B. y Singer, S. R. 2014. How cells divide (¿Cómo se dividen las células?). En *Biology (Biología)* (10a ed., AP Ed.). Nueva York, NY: McGraw- Hill, 200-201.
197. Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V. y Jackson, R. B. 2011. The cell cycle (El ciclo celular). En *Campbell biology* (10a Ed.). San Francisco, CA: Pearson, 244.
198. Reppeto, M.; Reppeto, G. 2009. *Toxicología fundamental*. Ediciones Díaz de Santos. ISBN: 978-84-7978-898-8
199. RISCTOX (Base de datos de sustancias tóxicas y peligrosas). 2010. Gobierno de España. Ministerio de Trabajo, migraciones y seguridad social. Disponible en: <https://risctox.istas.net/index.asp?idpagina=621#:~:text=La%20exposici%C3%B3n%20a%20corto%20plazo,y%20trastornos%20de%20la%20memoria>.
200. Riojas, H.; Schilman, M; Lopez, L.; Finkelman, J. 2013. La salud ambiental en México: situación actual y perspectivas futuras. *Salud pública mexicana*, 55(6).
201. Rivera, R.; Palacios, O.; Chávez, J.; Belmont, M.A.; Nikolski, I.; De la Isla; M.A.; Guzmán, A.; Terrazas, L.; Carrillo, R. 2007. Contaminación por coliformes y helmintos en los ríos Texcoco, Chapingo y San Bernardino tributarios de la parte oriental de la cuenca del Valle de México. *Rev. Int. Contaminación Ambiental*, 23 (2) 69-77.
202. Rodríguez, J.A.; García, J.A. 2021. Actualización del Inventario Nacional de Emisiones de 2013 para la modelación de la calidad del aire en el centro de México. *Revista Internacional Contaminación Ambiental*, 37, 463-487. <https://doi.org/10.20937/RICA.53865>

203. Rodríguez Espinosa, Pedro F; Martínez Tavera, Estefanía; Morales García, Sandra Soledad; Shruti Venkata Chari, Milán Valdés, Saúl. 2014. Resultados de los Estudios Geo-Ambientales en la Cuenca del Alto Atoyac, Tlaxcala, Puebla, México (2013-2014). 30 aniversario del CIEMAD 2º Coloquio en Celebración del Día Mundial del Medio Ambiente. Disponible en <https://docplayer.es/61992971-Resultados-de-los-estudios-geo-ambientales-en-la-cuenca-del-alto-atoyac-tlaxcala-puebla-mexico.html>
204. Rodríguez, J.C.; Eliana, C.; Pollack, L. 2018. Cytotoxicity and genotoxicity of gold nanoparticles synthesized by laser ablation on *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae). *Arnaldoa* 25 (3): 1015-1026.
205. Rojas, M.P.; 2010. Peroxidación de lípidos y sus efectos sobre la salud. 10(3):1-8. Disponible en: http://www.palmadeaceite.org/bigdata/lapalma/pdf/lipidos_y_salud_3.pdf Consultado 10 de mayo de 2020.
206. Roldan, E. 2016. Introducción a la toxicología. Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Toxico-ago18.pdf>. Consultado 28 de noviembre de 2020.
207. Rubio, S.P. 2019. malformaciones congénitas en neonatos relacionadas con contaminación ambiental. Tesis de licenciatura, Universidad Técnica de Ambato, facultad ciencias de la salud carrera de medicina.
208. Russell, P.J. 2002. Chromosomal Mutation, In: B. Cummings (Ed.), Genetics, Pearson Education Inc., San Francisco, Pp. 595–621.
209. Rutstein RM, Feingold A, Meislich D, Word B, Rudy B. 1997. Protease inhibitor therapy in children with perinatally acquired HIV infection. *AIDS*; 11: 1487-1494.
210. Sabeen, M. 2020. *Allium cepa* assay based comparative study of selected vegetables and the chromosomal aberrations due to heavy metal accumulation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27 (2020) 1368–1374.
211. Sai-Nan Guoa; Jia-Lang Zhenga; Shuang-Shuang Yuana; Qing-Ling Zhub; Chang-Wen Wua. 2017. Immunosuppressive effects and associated compensatory responses in zebrafish after full life-cycle exposure to environmentally relevant. *Aquatic Toxicology*, 188 (2017) 64–71.
212. Salazar, S.A.; Quintero, J.D. 2020. Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L as bioindicator. *Science of the Total Environment*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.13445>
213. Saldaña F.; Gómez, B. 2006. Caracterización de fuentes puntuales de contaminación en el río Atoyac, México. Memorias. XXX Congreso. Interamericano. Ingeniería Sanitaria y Ambiental.
214. Saldaña, P. 2002. Calidad del agua en colectores de la ciudad de Puebla y la aplicación de análisis de toxicidad. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental Cancún, México.
215. Saleh, Y.; Marie, MA. 2016. Use of *Arius thalassinus* fish in a pollution biomonitoring study, applying. *Marine Pollution Bulletin*. 106, 308–322.
216. Sánchez, C.; Matamoros, M.; Bedmar, E.; Delgado, E.J.; Becana, M. 2011. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en nódulo de leguminosas. *Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-*

- microorganismos, 35-48. Disponible en https://digital.csic.es/bitstream/10261/110603/1/BecanaM_CapLib_2011.pdf
217. Sandoval Villasana Ana María; Pulido-Flores Griselda; Monks Scott; Gordillo Martínez Alberto José; Villegas Villarreal Elba Cristina. 2009. Evaluación fisicoquímica, microbiológica y toxicológica de la degradación ambiental del río Atoyac, México. *Interciencia*, 34:(12), 880-887. Disponible en: https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI_Helminfos/Griselda_Pulido/sandoval_2009a.pdf.
218. Sarabia, E.; Álvarez, M.G.; Pérez, D.; Zavala, F. 2019. Impacto microbiológico y toxicológico del cauce del río Balsas, región tierra caliente de Guerrero. *Revista Biológico Agropecuario, Tuxpan*. 7(1): 1-15
219. Sarabia Meléndez, Irma Francisca. Cisneros Almazán, Rodolfo. Aceves de Alba, Jorge, Durán García Héctor Martín. Castro Larragoitia, Javier. 2011. Calidad del agua de riego en suelos agrícolas y cultivos del Valle de San Luis Potosí, México. *Revista Internacional Contaminación y Medio Ambiente*. 27(3), 103-113. Disponible en: www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992011000200002, Consultado (28 de agosto de 2019).
220. Schmalz, W. F. Jr.; Hernandez, A. D. & Weis, P. 2002. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Mar. Environ. Res.*, 54:539-42
221. SCIAN (Sistema de Clasificación Industrial de América del Norte, México). 2018. www.inegi.org.mx
222. SEMARNAT (Secretaría de Marina y Recursos Naturales). 2022. Definición y objetivo de la evaluación del impacto ambiental. Disponible en: <https://www.gob.mx/semarnat/acciones-y-programas/definicion-y-objetivo-de-la-evaluacion-del-impacto-ambiental>
223. SEMARNAT (Secretaría de Marina y Recursos Naturales). 2020. Agua. Disponible en: <https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe15/tema/cap6.html>
224. SEMARNAT (Secretaría de Marina y Recursos Naturales). Compendio de estadísticas ambientales 2008. Disponible en: https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe_2008/compendio_2008/compendio2008/10.100.8.236_8080/ibi_apps/WFServlet1bdc.html
225. SEMARNAT (Secretaría de Marina y Recursos Naturales). 2015. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México.
226. SEMARNAT (Secretaría de Marina y Recursos Naturales). Estadísticas del Agua en la cuenca del Río Balsas, 2010. Comisión Nacional del Agua Organismo de Cuenca Balsas. 2010. Available online: http://centro.paot.org.mx/documentos/conagua/RIO_BALSAS_.pdf
227. Sepúlveda, Leticia. 1999. La Contaminación Ambiental. Ministerio de Educación. Santiago, 1999.
228. Siddiqui S, Singh A, Alia S, Yadav M, Pandey V, Sharma D. 2019. Metalotioneína: objetivo terapéutico potencial para el osteosarcoma. *J Oncol Sci*. 5 :13–8. doi: 10.1016/j.jons.2019.02.002.
229. Silbergeld, E. 2014. *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*, 33: 2. Disponible en:

[http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tom o1/33.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tom%201/33.pdf)

230. Silva, José T. Estrada, Francisco. Rodríguez, Ramiro. Ochoa, Salvador. Villalpando, Fabián. Cruz, Gustavo. 2010. Vulnerabilidad Acuifera como Herramienta de Política Ambiental para la protección de Manantiales en Michoacán, México. *Revista Internacional Contaminación Ambiental*. 26(1), 5-16. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992010000100001. Consultado: 28 de agosto de 2019.
231. Silva, J.; Fuentealba, C.; Bay-Schmith, E.; Larrain, A. 2007. Estandarización del bioensayo de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un tóxico de referencia. *Gayana* 71(2): 135-141.
232. Soto Montes de Oca, Gloria. 2019. Valor de la restauración de ríos cuando se vive cerca y lejos. La Cuenca de Atoyac en Puebla, México. *Instituto Mexicano de Tecnología del Agua*, 10(1), 177-206. DOI: 10.24850/j-tyca-2019-01-07
233. Srivastava, S.; Thakur, I.S. 2006. Isolation and process parameter optimization of *Aspergillus* sp. for removal of chromium from tannery effluent. *Biores. Technol.* 97:1167-1173.
234. Sufia Sultana; Ashraf Dewan. 2021. A reflectance-based water quality index and its application to examine degradation of river water quality in a rapidly urbanising megacity. *Environmental Advances*, 5 (2021) 100097
235. Surasky, J.; Morosi, J. 2013. La relación entre los seres humanos y la naturaleza: construcción, actualidad y proyecciones de un peligro ambiental. *Instituto de relaciones internacionales*. ISSN 2344-956X.
236. Sykora, V.; Clavijo, A.; Kronberg, M.F.; Díaz, S.; Gómez, C.; Munarriz, E.; Rosse, A. 2021. Aplicación de bioensayos ecotoxicológicos para evaluar la calidad del agua del arroyo Cañuelas (Buenos Aires, Argentina). *Tecnologías y ciencias del agua*.
237. Tapia, L.M. 2002. Función de las Metalotioneínas en el metabolismo celular e cobre. *Universidad de Chile Facultad de Ciencias*. Disponible en: http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/106697/tapia_l.pdf?sequence=4&isAllowed=y. Consultado 07 de mayo de 2020.
238. Timothy, O.; M. Olorunfemi, D.I.; Ovuakporie, O. 2014. Cytotoxic and genotoxic properties of leaf extract of *Icacina trichantha* Oliv. *South African Journal of Botany*, 91(2014) 71-74.
239. Tomaille, J.; Iannacone, J. 2018. Toxicidad letal y subletal del arsénico, cadmio, mercurio y plomo sobre el pez *Parachaeirodon innesi* neon tetra (Characidae). *Rev. Toxicol* 35: 95 – 105.
240. Tomé, G.; Méndez, J. A.; Ramírez, J.; Pérez, N. 2017. Transformaciones socioeconómicas territoriales en el municipio de San Martín Texmelucan, México 1980-2010. *Revista Electrónica Nova Scientia*. 9: (1), 437 – 458
241. Toro, B. 2011. Uso de los biomarcadores en la evaluación de la contaminación. *Revista.luna.azúl, Universidad de Caldas*; 32: 121-127
242. Torres, I.; Pérez, J. I. 2016. Biomarcadores y práctica clínica. *Sistema Sanitario de Navarra*, 39 (1), 5-6. Disponible en <http://dx.doi.org/10.4321/S1137-6627/2016000100001>

243. Torres, G. A.; González, S. Peña E. 2010. Descripción Anatómica, Histológica y Ultraestructural de la Branquia e Hígado de Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Morphology*, 28(3):703-712.
244. Turri, E. 1993. Los ríos y el curso de la historia. *El correo de la UNESCO*, número 9, 4-8.
245. Ureña, R. 2007. Metalotioneínas en peces y gasterópodos: su aplicación en la evaluación de la contaminación. departamento de biología funcional y antropología física, Universidad de valencia. Disponible en: <https://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/15114/ure%f1a.pdf?sequence=1>
246. Uzma, N.; Kumar, B.S.; Hannan, M.A. 2010. Exposure to Benzene Induces Oxidative Stress, Alters the Immune Response and Expression of p53 in Gasoline Filling Workers. *American journal of industrial medicine* 53:1264–1270.
247. Valencia, J.C. 2015. Desarrollo de la región hidrológica del Balsas mediante la modificación de su veda. *Tecnología ciencia agua*, 6(1).
248. Valencia, R.; Waliszewski, S.; Gómez, J.L.; Suárez, J.; Sánchez, J. 2011. Evaluación de riesgos por exposición a contaminantes ambientales presentes en las aguas del sistema hidrológico Atoyac-Zahuapan. *ResearchGate*.
249. Valencia, J.C. 2008. La Gestión del Agua en México. El caso de la cuenca del Río Balsas. Expo Zaragoza. Disponible en: <https://www.zaragoza.es/contenidos/medioambiente/cajaAzul/8B-S3-P1-Juan%20Carlos%20Valencia%20ACC.pdf>
250. Valko, M.; Morris, H.; Cronin, D. 2005. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 1161-1208.
251. Vallejo Román, Janett. 2016. Talleres de mezclilla y transformaciones socio ambientales en un municipio rural. El caso de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala. El Colegio de la Frontera Sur Campeche, México. *Rev. México Sociedad y Ambiente*, núm. 11, pp. 68-91 Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=455748464005>
252. Vargas, Franklin.; Rivas, Carlos., Nursamaa, Abdoel.; Zoltan, Tamara. 2007. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en Química*, 2(2), 3-15.
253. Varona, M.; Ibáñez, M.; Briceño, L.; Herrera, D.; Chuaire, L.; Martínez, M.; Sánchez, M.C.; Palma, R.; Narváez, D.; Groot, H. 2020. Biomarcadores de susceptibilidad y efecto en pintores de carros expuestos a solventes orgánicos. *Colombia Médica*.
254. Vázquez, L.; Jiménez, V.H.; Santa Cruz, S.A.; García, R.; Aguirre, A.; del Coro, M.; Navarro, A.G. 2018. Aves del Alto Balsas de Guerrero: diversidad e identidad ecológica de una región prioritaria para la conservación. *Rev. Mex. Biodiv.* 89(3).
255. Vélez, M., 2015. Evaluación de los Indicadores de Estrés oxidativo Asociados a las características de nado en elasmobranquios y teleósteos (Tesis Doctoral). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC. Disponible en: https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/100/1/velez_m.pdf. Consultado 12 de mayo de 2020.

256. Venereo, J. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 31:(2), 126-133. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572002000200009
257. Walum, E. 1998. Acute Oral Toxicity. *Environmental Health Perspectives*. 106:(2), 497-503.
258. Wang, Shuang; Miller, Sophie; Ober, Elke; Sadler, Kirsten. 2017. Current Topics in Developmental Biology. 161-195. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.11.012>
259. WWF. Fondo Mundial para la Naturaleza. 2012. El aumento del consumo y el incremento en el uso de recursos por una población creciente ponen una presión insostenible para nuestro planeta. Disponible en: https://wwf.panda.org/wwf_news/?204748/informeplanetavivocommundial
260. Xu, H.; Gao, Q.; Yuan, B. 2022. Analysis and identification of pollution sources of comprehensive river water quality: Evidence from two river basins in China. *Ecological Indicators*.
261. Yu, H.G.; Hiatt, E.N.; Dawe, R.K. 2000. The plant kinetochore. *Trends Plant Sci*. 5: 543-547.
262. Zambrano, J. 2021. Contaminación del Atoyac, una historia que supera la media centuria: ONG. Fondo para la comunicación y la Educación Ambiental, A.C. Disponible en: <https://agua.org.mx/puebla-contaminacion-del-atoyac-una-historia-que-supera-la-media-centuria-ong-milenio/>
263. Zapata, A. G. 2001. La Regulación Del Ciclo Celular: Modelos Experimentales Sencillos Que Resultan En Premios Nobel. *Anales De La Real Academia De Farmacia*, 67(4), 507–519. [Doi.Org/10.1016/J. Jsc.2007.01.007](https://doi.org/10.1016/J.Jsc.2007.01.007).
264. Zhang, I.; Gao, S.; Wei, B.; Li, Y.; Li, H.; Wang, L.; Ye, B. 2017. Effects of Urbanization on Rural Drinking Water Quality in Beijing, China. *Sustainability* 2017, 9, 461; [doi:10.3390/su9040461](https://doi.org/10.3390/su9040461)

ANEXOS

Anexo 1. Clasificación de actividades económicas del sector secundario (manufacturero)

Código	Actividad
3110	Industria alimentaria
3120	Industria de las bebidas y del tabaco
3130	Fabricación de insumos textiles y acabado de textiles
3140	Fabricación de productos textiles, excepto prendas de vestir
3150	Fabricación de prendas de vestir
3160	Curtido y acabado de cuero y piel, y fabricación de productos de cuero y piel
3210	Industria de la madera
3220	Industria del papel
3230	Impresión e industrias conexas
3240	Fabricación de productos derivados del petróleo y del carbón
3250	Industria química
3260	Industria del plástico y del hule
3270	Fabricación de productos a base de minerales no metálicos
3310	Industrias metálicas básicas
3320	Fabricación de productos metálicos
3330	Fabricación de maquinaria y equipo
3340	Fabricación de equipo de computación, comunicación, medición y de otros equipos, componentes y accesorios electrónicos
3350	Fabricación de accesorios, aparatos eléctricos y equipo de generación de energía eléctrica
3360	Fabricación de equipo de transporte y partes para vehículos automotores
3370	Fabricación de muebles, colchones y persianas

Clasificación para actividades económicas, INEGI 2007.

Consultado en: <http://sanmartintexmelucan.blogspot.com/2010/04/actividad-economica-en-san-martin.html>

Anexo 2. Evaluación Rápida de Fuentes Contaminantes (ERFCA).

Cuadro 1. Cargas contaminantes provenientes de efluentes industriales

Industria y proceso	Carga contaminante								
	DBO ₅ Kg/m ³	DQO Kg/m ³	SST Kg/m ³	Zn Kg/m ³	Cr Kg/m ³	Pb Kg/m ³	CN Kg/m ³	Ni Kg/m ³	Cd Kg/m ³
Producción de alimentos									
Productos lácteos	2.2	-	2.2	-	-	-	-	-	-
Enlatados de frutas y verduras	1.1	-	4.3	-	-	-	-	-	-
Industria de bebidas									
Destilerías de alcohol	3.5	-	257	-	-	-	-	-	-
Fábrica de refrescos	0.3	-	1.3	-	-	-	-	-	-
Producto metálico manufacturado									
Enseres domésticos	0.3	1.5	0.2	0.01	0.002	0.0004	-	-	-
Galvanoplastia de Cu	-	-	-	0.007	-	-	0.01	-	-
Galvanoplastia de Ni	-	-	-	-	-	-	-	0.003	-
Galvanoplastia de Cr203	-	-	-	-	0.02	-	-	-	-
Galvanoplastia de Zn	-	-	-	0.1	-	-	0.02	-	-
Galvanoplastia de Cd	-	-	-	-	-	-	0.02	-	0.001
Manufactura de cuero									
Tenerías de cuero	1.7	5.2	2.7	-	0.07	-	-	-	-
Manufactura de pulpa y papel									
Pulpa sulfatada	1.4	-	0.3	-	-	-	-	-	-
Pulpa semiquímica	0.6	-	0.3	-	-	-	-	-	-
Fábrica de papel	0.1	-	0.4	-	-	-	-	-	-
Manufacturas textiles									
Algodón	45	78	30	-	-	-	-	-	45
Nylon	125	216	87	-	-	-	-	-	125
Acrílico	100	320	95	-	-	-	-	-	100
Poliéster	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Visto y modificado de <http://cidbimena.desastres.hn/pdf/spa/doc1845/doc1845.htm>

Cuadro 2. Cargas contaminantes provenientes de efluentes industriales

Industria y proceso	DBO ₅ Kg/T	DQO Kg/T	SST Kg/T	Cu Kg/T	Cr Kg/T	Zn Kg/T	NaOH Kg/T	Hg Kg/T
Manufactura de automotores	0.3	1.5	0.2	-	0.002	0.01	-	-
Productos químicos								
Butadieno								
Acetileno								
Óxido de etileno								
Formaldehído								
Dicloroetileno								
Cloruro de vinilo	0.3	5.8	0.2	0.002	0.07	0.02	0.03	0.0004
Fenol								
Etilenglicol								
Acrilatos								
Metilmetacrilatos								
Ácido tereftálico								

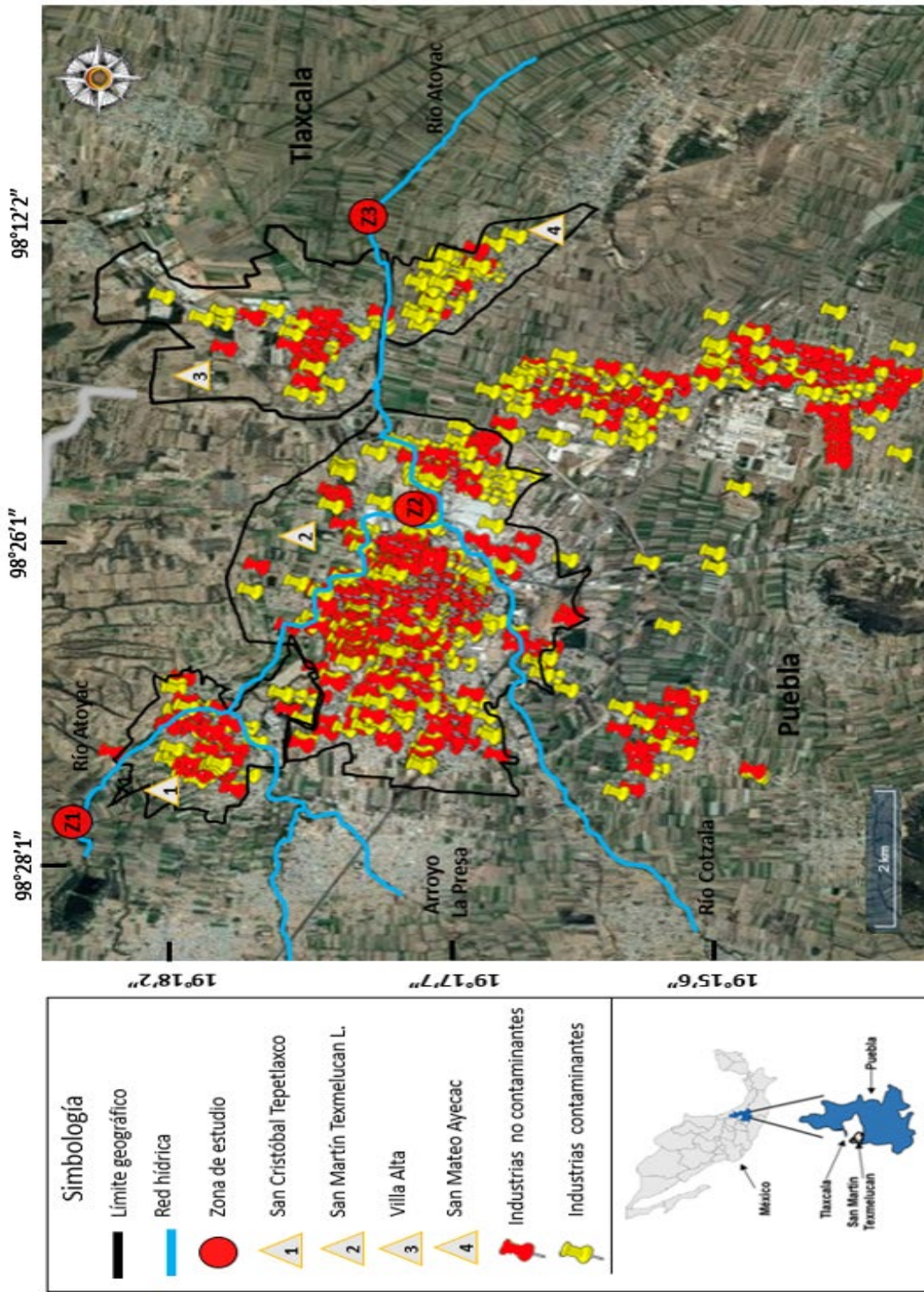
Visto y modificado de <http://cidbimena.desastres.hn/pdf/spa/doc1845/doc1845.htm>

Cuadro 3. Cargas contaminantes provenientes de efluentes domésticos

Población	DBO ₅ Kg/T	DQO Kg/T	SST Kg/T	SDT Kg/T
1000 habitantes	0.3	0.6	0.3	0.5

Visto y modificado de <http://cidbimena.desastres.hn/pdf/spa/doc1845/doc1845.htm>

Anexo 3. Mapa con las unidades económicas (DENUE, 2019) localizadas en las tres zonas de estudio en San Martín Texmelucan.



Anexo 4. Guía de la OCDE 203 para pruebas de toxicidad de sustancias químicas con peces.

Descripción del método

1. Aparatos

Equipo de laboratorio y especialmente lo siguiente:

- Medidor de oxígeno
- Equipo para la determinación de la dureza del agua
- Aparatos adecuados para el control de la temperatura
- Tanques hechos de material químicamente inerte y de una capacidad adecuada en relación con la carga recomendada.

2. Selección de especies

Se pueden utilizar una o más especies, quedando la elección a discreción del laboratorio de pruebas. Se sugiere que las especies utilizadas se seleccionen sobre la base de criterios prácticos tan importantes como, por ejemplo, su disponibilidad inmediata durante todo el año, facilidad de mantenimiento, conveniencia para pruebas y cualquier factor económico, biológico o ecológico relevante. Los peces deben gozar de buena salud y libres de cualquier malformación aparente.

3. Periodo de asentamiento

Después de adquirir los peces se permitirá un periodo de asentamiento para los ejemplares, se registran las muertes y se aplican los siguientes criterios:

- Mortalidad de más del 10 % de la población en siete días: rechazo de la totalidad lote
- Mortalidad de entre el 5 y el 10 % de la población: la aclimatación continua durante siete días adicionales
- Mortalidad inferior al 5 % de la población: aceptación del lote

4. Manejo de los peces

Los peces deben mantenerse en agua limpia de calidad en el laboratorio durante al menos 12 días antes de su uso para las pruebas y bajo las siguientes condiciones:

- Luz: fotoperíodo de 12 a 16 horas diarias
- Temperatura: adecuada a la especie
- Oxígeno: concentración: al menos el 80 por ciento del valor de saturación del aire
- Alimentación: diariamente hasta 24 horas antes de comenzar la prueba

5. Procedimiento

Condiciones de exposición

- Duración: 96 horas bioensayo agudo y 28 días bioensayo crónico
- Carga: la carga máxima de 1,0 g de pez/litro para pruebas estáticas y semiestático es recomendado; para los sistemas de flujo continuo se puede aceptar una carga mayor.
- Luz: fotoperíodo de 12 a 16 horas diarias.
- Temperatura: adecuada a la especie y constante en un rango de $\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Oxigenación: no menos del 60 % del valor de saturación del aire. Se puede usar aireación siempre que no conduzca a una pérdida significativa de la sustancia de ensayo.
- Alimentación: Dos veces al día
- Perturbación: deben evitarse las perturbaciones que puedan cambiar el comportamiento de los peces.

6. Número de peces

Se deben usar al menos 7 peces en cada concentración de prueba y en los controles.

7. Observaciones

Los peces se deben inspeccionar al menos cada 24 horas y se consideran muertos si no hay movimiento visible (por ejemplo, movimientos branquiales). Los peces muertos se deben eliminar cuando se observan y se registran las mortalidades. Se deben llevar registros de anomalías visibles como falta de apetito, pérdida de equilibrio, comportamiento de natación, función respiratoria, pigmentación, etc. Las mediciones de pH, OD y la temperatura deben realizarse al menos una vez al día.