



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

**EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA CON LOMBRIZ DE TIERRA (*Eisenia andrei*)
EXPUESTA A DIFERENTES RESIDUOS SÓLIDOS DE MINA DE SAN LUIS
POTOSÍ, MÉXICO**

PRESENTA

ING. AMB. Romy Patricia Díaz Pérez

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Guillermo Espinosa Reyes

ASESORES

Dr. César Arturo Ilizaliturri Hernández

Dr. Israel Razo Soto

“Los labios de la sabiduría permanecen cerrados, excepto para el oído capaz de comprender. Donde quiera que estén las huellas del Maestro, allí los oídos del que está pronto para recibir sus enseñanzas se abren de par en par. Cuando el oído es capaz de oír, entonces vienen los labios que han de llenarlos con sabiduría. Los principios de la verdad son siete: el que comprende esto perfectamente, posee la clave mágica ante la cual todas las puertas del templo se abrirán de par en par”.

Hermes Trimegistro

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

PROYECTO REALIZADO EN:

El Departamento de Toxicología Ambiental – Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud de la Facultad de Medicina – CIACYT

A TRAVÉS DE LOS PROYECTOS DENOMINADOS:

Monitoreo de la actividad biológica y del potencial genotóxico de suelos áridos contaminados por metales pesados en San Luis Potosí, México (CB-178778).

Diseño y construcción de un equipo móvil de remediación ex situ de suelos contaminados por hidrocarburos para emergencias y pasivos ambientales aplicando surfactantes y oxidantes químicos (PEI-221377).

CON FINANCIAMIENTO DE:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-No. Becario: 554607).

DEDICATORIA

A todas aquellas personas que no han tenido la oportunidad de estudiar.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, *Ana Patricia Pérez Castillo* y *Gonzalo S. Díaz Torres*, quienes me han dado la oportunidad de enriquecerme en los aspectos personales de mi vida, permitiéndome vivir diferentes escenarios que me han sensibilizado y abierto la mente para salirme del sendero predispuesto; les agradezco su amor, confianza, apoyo y tolerancia que han tenido en mi desarrollo.

A mi hermano, *Roy Benjamín Díaz Pérez*, por seguir siendo mi objetivo a alcanzar y mi ejemplo en muchos aspectos, gracias por ser mi primer amigo.

A *Jorge Antonino Moreno Estrada*, pese al corto tiempo de conocernos me has mostrado que mi mundo imaginario y utópico sí existe, gracias por mostrarme que se puede ver y sentir libremente, además, te agradezco por todo el apoyo que me has brindado en tan poco tiempo.

A *mis profesores*, a los Dres. Guillermo, César, Jesús e Israel, por guiarme en este proceso académico, por su confianza, por su tiempo, por sus conocimientos pero sobre todo por su paciencia, muchas gracias.

A la *Resp.: Log.: Simb.: Fem.: Martha Washington No. 10*, conocerlas y pertenecer a esta augusta institución ya ha marcado y trascendido la historia de mi vida.

A *todos con quienes he formado una amistad en el CIACYT*, gracias por compartir sus conocimientos, amistad y hacer este proceso académico muy ameno con su compañía, especialmente agradezco a Lulú quien mi apoyo tantas veces con mis materiales de laboratorio y a Susy por apoyarme en la parte experimental para el desarrollo de la presente tesis.

A *mis amigos del laboratorio de bioprocesos de la UJAT (Jessica, Merce, Nuith, Reyna, Vivi, Wendy, Edgar y Julio)*, quienes no me han permitido olvidar que soy tabasqueña, gracias por su amistad y que pese a la distancia siento que convivo diariamente con ustedes.

A *los amigos que he tenido en SLP*, especialmente a Claudia, Ángel y Miguel, les agradezco por ser esa importante parte recreacional.

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, por haberme permitido ser parte de la selección deportiva, brindándome la oportunidad de entrenar con alto rendimiento.

A todas aquellas personas que me han apoyado y no lo noté.

Instituciones

Al Departamento de Toxicología Ambiental – Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud (CIAAS) de la Facultad de Medicina – y al Centro para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACYT), por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo.

Al Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales (PMPCA) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), por la formación académica recibida en sus aulas; la Maestría en Ciencias Ambientales recibe apoyo a través del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. Becario: 554607) para la realización de la presente tesis de investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 14 |
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 15 |
| CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES | 17 |
| 1.1 PROBLEMÁTICA DE LOS SITIOS DE ESTUDIO | 20 |
| 1.2 JUSTIFICACIÓN | 30 |
| 1.3 OBJETIVOS | 31 |
| 1.4 EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA | 32 |
| 1.5 LOMBRIZ DE TIERRA (<i>E. ANDREI</i>) | 34 |
| 1.6 CARACTERÍSTICAS AMBIENTALES | 38 |
| 1.7 BIOENSAYO CON LOMBRIZ DE TIERRA | 39 |
| 1.8 BIOMARCADOR EN LOMBRIZ DE TIERRA | 41 |
| 1.9 EFECTOS TOXICOLÓGICOS POR METALES Y ARSÉNICO | 43 |
| 1.10 ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA | 44 |
| 1.11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 45 |
| CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS | 52 |
| <i>INTRODUCCIÓN</i> | 53 |
| 2.1 SITIOS DE ESTUDIO | 54 |
| 2.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SUELO Y RESIDUO | 55 |
| 2.3 MEDICIÓN DE PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS EN MUESTRAS AMBIENTALES | 56 |
| 2.4 CUANTIFICACIÓN DE METALES Y ARSÉNICO | 57 |
| 2.5 VALORES UMBRALES DE LAS CONCENTRACIONES DE METALES Y METALOIDES EN SUELO | 58 |
| 2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 58 |
| 2.7 RESULTADOS | 60 |
| 2.8 DISCUSIÓN | 73 |
| 2.9 CONCLUSIÓN | 76 |
| 2.10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 77 |
| CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA: BIOENSAYOS DE MORTALIDAD Y MIGRACIÓN | 81 |



| | |
|--|------------|
| <i>INTRODUCCIÓN</i> | 82 |
| 3.1 SELECCIÓN DE ESPECIE DE PRUEBA | 84 |
| 3.2 ESTANDARIZACIÓN DE LAS PRUEBAS | 86 |
| 3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL | 86 |
| 3.4 METODOLOGÍA | 87 |
| 3.4.1 BIOENSAYO DE MORTALIDAD | 88 |
| 3.4.2 BIOENSAYO DE MIGRACIÓN | 89 |
| 3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 91 |
| 3.6 RESULTADOS | 92 |
| 3.7 DISCUSIÓN | 95 |
| 3.8 CONCLUSIÓN | 98 |
| 3.9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 99 |
| <u>CAPÍTULO 4. EVALUACIÓN GENOTÓXICA: ENSAYO COMETA</u> | 102 |
| <i>INTRODUCCIÓN</i> | 103 |
| 4.1 METODOLOGÍA | 105 |
| 4.1.1 DISEÑO EXPERIMENTAL | 105 |
| 4.1.2 BIOMARCADOR DE EXPOSICIÓN | 105 |
| 4.1.3 GENOTOXICIDAD (ENSAYO COMETA) | 106 |
| 4.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 113 |
| 4.3 RESULTADOS | 114 |
| 4.3.1 BIOMARCADOR DE EXPOSICIÓN | 114 |
| 4.3.2 BIOMARCADOR DE EFECTO | 115 |
| 4.4 DISCUSIÓN | 125 |
| 4.5 CONCLUSIÓN | 129 |
| 4.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 131 |
| <u>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES</u> | 135 |
| <u>RECOMENDACIONES</u> | 138 |
| <u>ANEXO FOTOGRÁFICO</u> | 139 |
| <u>GLOSARIO</u> | 143 |

ÍNDICE DE TABLA

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Operaciones de la minería y metalurgia, y su generación de residuos sólidos de mina. Fuente: propia. | 18 |
| Tabla 2. Valores de referencia por país según el uso del suelo y receptor ecológico, concentración dada en mg/kg. | 58 |
| Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de las muestras. | 60 |
| Tabla 4. Concentraciones (mg/kg) de EPT en los sitios de muestreo. | 61 |
| Tabla 5. Porcentaje de supervivencia por sitio (bioensayo de mortalidad), y control negativo. | 92 |
| Tabla 6. Porcentaje de inmigración por sitio (prueba de migración). | 93 |
| Tabla 7. Concentración de metales y As en lombriz. | 114 |

ÍNDICE DE FIGURA

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ubicación espacial de los sitios de estudio, a, Cedral; b, Villa de la Paz; c, Charcas; d, Cerro de San Pedro. | 22 |
| Figura 2. Ciclo vida de la lombriz <i>E. andrei</i> . | 35 |
| Figura 3. Sistema digestivo de la lombriz y su fisiología principal. Recuperado de Compagnoni & Putzolu, 1995. | 36 |
| Figura 4. Corte histológico del cuerpo de la lombriz (sección transversal) para identificar el celoma, recuperado de http://faculty.southwest.tn.edu/jwilliams/earthworm.htm | 42 |
| Figura 5. Diagrama de flujo para describir la metodología. | 44 |
| Figura 6. Ubicación geográfica de los sitios de estudio, recuperado de Montes-Rocha (2016). | 54 |
| Figura 7. Fases para la toma de muestra ambiental; (a) unidad de muestreo: muestreo dirigido o juicios de experto, (b) muestra compuesta: formada por cuatro sub-muestras, (c) profundidad de cada sub-muestra, (d) tamizado de la muestra in situ: malla 707 μm . | 56 |
| Figura 8. Pb: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Cedral. | 62 |
| Figura 9. Zn: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Cedral. | 62 |
| Figura 10. Pb: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Charcas. | 63 |
| Figura 11. Zn: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Charcas. | 63 |
| Figura 12. Pb: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Cerro de San Pedro. | 64 |
| Figura 13. Zn: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Cerro de San Pedro. | 65 |
| Figura 14. As: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Villa de la Paz. | 66 |
| Figura 15. Pb: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Villa de la Paz. | 66 |
| Figura 16. Zn: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Villa de la Paz. | 67 |
| Figura 17. As: diferencia estadística entre las muestras de los sitios problema. | 68 |
| Figura 18. Cu: diferencia estadística entre las muestras de los sitios problema. | 69 |
| Figura 19. Pb: diferencia estadística entre las muestras de los sitios problema. | 69 |
| Figura 20. Zn: diferencia estadística entre las muestras de los sitios problema. | 70 |
| Figura 21. Lombriz: <i>Eisenia andrei</i> . | 84 |



| | |
|--|-----|
| Figura 22. Bioensayos de Mortalidad. | 88 |
| Figura 23. Contenedores de seis cámaras: a, dimensiones internas; b, dimensiones externas; c, contenedor completo. Modificado de Cuevas et al., 2012. | 90 |
| Figura 24. Distribución de las muestras ambientales y el control negativo. i) Control negativo, ii) Suelo de referencia, iii) Residuo sólido de mina. Vista frontal. | 91 |
| Figura 25. Movilidad de lombrices expuestas. Vista posterior. | 91 |
| Figura 26. Comparación por muestras y por sitios de la pérdida de peso en lombriz. | 93 |
| Figura 27. Preparado de portaobjetos con Agarosa Regular. | 107 |
| Figura 28. Tubo Eppendorf con Medio de Cultivo RPMI 1640 y con lombriz. | 107 |
| Figura 29. Fluido celómico a partir de la punción sobre el clitelo. | 107 |
| Figura 30. Homogenizado de fluido celómico y Medio RPMI 1640 | 108 |
| Figura 31. Alícuota de homogenizado del Medio de Cultivo y el celoma de lombriz. | 108 |
| Figura 32. Portaobjetos con capas de Agarosa Regular. | 108 |
| Figura 33. Película delgada de agarosa con celoma. | 109 |
| Figura 34. Vasos de Coplin con solución de lisis. | 109 |
| Figura 35. Área de trabajo dentro del cuarto frío. | 110 |
| Figura 36. Preparación de los portaobjetos dentro de la cámara de electroforesis. | 110 |
| Figura 37. Portaobjetos en los 5 min de desenrollado de las cadenas de ADN. | 111 |
| Figura 38. Electroforesis en curso (la espuma indica que el equipo está corriendo correctamente). | 111 |
| Figura 39. Programación de la fuente de poder. | 111 |
| Figura 40. Caja con los portaobjetos con células fijadas. | 112 |
| Figura 41. Diferencia estadística del OTM en Cedral: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis). | 115 |
| Figura 42. Diferencia estadística del TL en Cedral: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis). | 116 |
| Figura 43. Diferencia estadística del OTM en Cerro de San Pedro: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis). | 117 |
| Figura 44. Diferencia estadística del TL en Cerro de San Pedro: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis). | 117 |
| Figura 45. Diferencia estadística del OTM en Charcas: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis). | 118 |
| Figura 46. Diferencia estadística del TL en Charcas: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis). | 118 |
| Figura 47. Diferencia estadística del OTM en Villa de la Paz: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis). | 119 |
| Figura 48. Diferencia estadística del TL en Villa de la Paz: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis). | 119 |
| Figura 49. Diferencia estadística del OTM de todos los sitios: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis). | 120 |
| Figura 50. Diferencia estadística del TL de todos los sitios: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis). | 120 |
| Figura 51. Diferencia estadística del OTM de todos los sitios: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis). | 121 |
| Figura 52. Diferencia estadística del OTM de todos los sitios: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis). | 121 |
| Figura 53. Gráfica múltiple de valores logarítmicos de OTM agrupados por la mediana de cada sitio. | 122 |
| Figura 54. Gráfica múltiple de valores logarítmicos de TL agrupados por la mediana de cada sitio. | 122 |
| Figura 55. Factor coordinante de las variables, basado en la asociación genotoxicidad-elemento. | 124 |
| Figura 56. Sitios de muestreo de Cedral: referencia y problema. | 140 |
| Figura 57. Cedral: sitio de referencia. | 140 |
| Figura 58. Cedral: sitio problema. | 140 |
| Figura 59. Sitios de muestreo de Cerro de San Pedro: referencia y problema. | 140 |

| | |
|---|-----|
| <i>Figura 60. Cerro de San Pedro: sitio de referencia.</i> | 141 |
| <i>Figura 61. Cerro de San Pedro: sitio problema.</i> | 141 |
| <i>Figura 62. Sitios de muestreo de Charcas: referencia y problema.</i> | 141 |
| <i>Figura 63. Charcas: sitio de referencia.</i> | 141 |
| <i>Figura 64. Charcas: sitio problema.</i> | 141 |
| <i>Figura 65. Sitios de muestreo de Villa de la Paz: referencia y problema.</i> | 142 |
| <i>Figura 66. Villa de la Paz: sitio de referencia.</i> | 142 |
| <i>Figura 67. Villa de la Paz: sitio problema.</i> | 142 |



RESUMEN

Este estudio evaluó el potencial tóxico de los residuos sólidos de mina de sitios con actividad minera antigua o reciente del Estado de San Luis Potosí (México); en cada municipio se seleccionó un sitio con residuo de minería y otro sin actividad minera u otra actividad humana cercana que impacte el suelo, este último se consideró sitio de referencia, además se utilizó *peat moss* como sustrato control negativo para validar las pruebas. En estos sitios se realizó un muestreo dirigido sobre los residuos de minería y el suelo de referencia, se recolectaron 10 muestras por sitio, haciendo un total de 20 muestras por municipio. Se evaluó el potencial tóxico en *Eisenia andrei* a partir de bioensayos de toxicidad (migración y letalidad) y un biomarcador genotóxico (ensayo cometa) en celomocito de lombriz. Se encontraron rangos de concentraciones medias de 9.80-28.25 mg/kg de As, 27.00-67.52 mg/kg de Pb, y 93.98-119.92 mg/kg de Zn en el sitio de referencia, y 1 456.01-8 437.95 mg/kg de As, 480.72 mg/kg de Cd, 162.50-9 094.52 mg/kg de Cu, 1 092.57-36 627.08 mg/kg de Pb, y 3 778.05-71 419.76 mg/kg de Zn en el sitio problema (residuos de mina), en todos los sitios problema se encontró que todas las concentraciones detectadas rebasan la concentración de seguridad para invertebrados de la US EPA y de la NOM-147 para As, Cd y Pb; se halló diferencia estadística ($p < 0.05$) entre los sitios problema y de referencia. La prueba de letalidad mostró letalidad en los sitios problemas de Cerro de San Pedro (36.5%) y Charcas (4%). El peso de las lombrices fue menor en los residuos sólidos de mina en comparación con los suelos de referencia y el control negativo. La prueba de migración resultó positiva, con evasión de las lombrices a los residuos. La prueba de genotoxicidad determinó que existe mayor efecto por exposición a los residuos de minería que a los suelos de referencia; con rangos de efecto medio de 3.56-6.65 de OTM y 9.51-16.64 de TL en los sitios de referencia, y 5.66-14.32 de OTM y 14.32-22.68 de TL en los sitios problema. Con base en este estudio se puede concluir que el sitio que presenta mayor afectación ambiental es Charcas, seguido de Cerro de san Pedro y Villa de la Paz, y finalmente Cedral, con enfoque hacia los organismos invertebrados edáficos.

INTRODUCCIÓN GENERAL

En México la minería ha estado presente en el desarrollo del país, en el estado de San Luis Potosí se explotan diferentes minerales como: arcilla, bentonita, caliza, cobre, fluorita, oro, plata, plomo, sal, sílice y zinc (INE, 2007; Servicio Geológico Mexicano, 2014). En el Panorama Minero del Estado de San Luis Potosí (2014) se menciona que el estado cuenta con 14 regiones mineras de donde destacan 13 distritos mineros y 23 zonas mineralizadas, en donde se encuentran Charcas, Cerro de San Pedro y Villa de la Paz que han destacado por su potencial de minerales metálicos y no metálicos; mientras que Cedral ha destacado por tener haciendas de beneficio en donde se recibía el material extraído de las minas del municipio aledaño Real de Catorce (Flores-Ramírez *et al.*, 2012; Barrera, 2013); estos sitios de estudio han beneficiado material que proviene del mismo tipo de yacimiento geológico denominado skarn.

La minería genera residuo sólidos de mina denominados jales y terreros, los cuales son depositados cercanos o muy alejados al yacimiento de donde proviene el material, estos permanecen a la intemperie en montículos que podrían llegar a tener el volumen de una montaña, además pueden recorrer importantes distancias a partir de las precipitaciones y al viento, dado que se encuentran expuestos a condiciones ambientales. Los ecosistemas que se encuentran en contacto con estos residuos pueden no soportar las elevadas cargas de EPT como arsénico, cadmio, cobre, plomo y zinc que se caracterizan por estar contenidos en estos residuos, pudiendo afectar a los diferentes receptores del ambiente sean bióticos y abióticos. Diversos estudios han demostrado que los metales pesados y arsénico en altas concentraciones pueden provocar daños desde nivel celular hasta nivel ecosistémico (Spurgeon *et al.*, 1994; Grumiaux *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Espinosa-Reyes *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016).

La toxicología identifica y cuantifica los efectos adversos sobre organismos, provocados por estresores ambientales (Silbergeld, 1998). Una forma para evaluar el potencial tóxico de estos residuos es a partir de pruebas de toxicidad como



bioensayos y biomarcadores que permiten evaluar la respuesta biológica en diversos organismos bajo condiciones controladas de laboratorio, estos organismos deben cumplir importancia ecológica en el suelo o edafón en donde se desarrollan de forma natural, favoreciendo su calidad física, química y biológica de este soporte de vida (Murphy, 2003).

Las lombrices de tierra son utilizadas como organismo de prueba por su importancia ecológica en el edafón, por sus antecedentes como organismos de prueba en estudios ecotoxicológicos, por su sensibilidad a los cambios en el suelo producto de la degradación antropogénica, por su elevada correlación con el ecosistema, por integrar datos (contaminante-efecto), por su bajo costo, por proporcionar una respuesta en corto tiempo (semanas-meses) y por generar resultados fáciles de interpretar (Neuhauser *et al.*, 1985). En los bioensayos se pueden generar resultados como de letalidad, reproducción, crecimiento, comportamiento, etc., en poblaciones de lombrices. La célula de lombriz puede ofrecer más información generada por los factores estresantes en el ambiente, a partir de biomarcadores de toxicidad con efectos sub-letales como el daño al ADN (Giulia-Lioneto, 2012).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES



La industria minera realiza extracciones de minerales provenientes de la corteza terrestre (Hartman & Mutmanský, 2002) de donde se desarrollan las etapas de exploración, minado, procesamiento de minerales, concentración y refinación (Tabla 1).

Tabla 1. Operaciones de la minería y metalurgia, y su generación de residuos sólidos de mina. Fuente: propia.

| ACTIVIDAD | ETAPAS | OPERACIONES | RESIDUOS SÓLIDOS DE MINA |
|------------|-------------|--|--------------------------|
| - | EXPLORACIÓN | Desmante Despalme | - |
| MINERÍA | MINADO | Barrenación Voladura | TERREROS |
| | BENEFICIO | Trituración Molienda Lavado del material | |
| | CONCENTRADO | Hidrometalurgia (Flotación/lixiviación) | JALES |
| METALURGIA | REFINACIÓN | Pirometalurgia Electrometalurgia | ESCORIA |

La etapa de exploración tiene como objetivo evaluar la calidad del mineral contenido en el yacimiento, y con ello, determinar si es económicamente explotable, a partir de estudios químicos de las rocas provenientes de la misma zona geológica; el minado (minería a cielo abierto o subterránea) consiste en extraer de las rocas la ley de mineral, desechando el material que no contenga minerales de valor económico denominado «terreros»; por otra parte, el mineral de valor económico continúa a la etapa de procesamiento de minerales; también conocido como beneficio de minerales, el cual consiste en trituración y molienda para reducir a menor tamaño granular las rocas extraídas, y de esta forma, separar el mineral o minerales de mena de los minerales de ganga, cabe señalar que por las modernas prácticas metalúrgicas, en esta etapa se pueden generar residuos con presencia de aditivos; la etapa de concentración o metalurgia de extracción, consiste en recuperar el elemento o compuesto de interés, a partir de las técnicas de lixiviación o flotación para obtener un concentrado, igualmente se producen y desechan residuos sólidos

finos con contenido de metales residuales «jales o residuos metalúrgicos»; por último, la refinación consiste en recuperar el metal de interés desde el concentrado para obtener los metales en estado de pureza, a partir de la pirometalurgia o electrometalurgia (Lottermoser, 2007; PROESMIN, 2014).

La continua y creciente demanda de los recursos minerales permitió detonar a la actividad minera, misma que ha contribuido en la formación de algunos importantes asentamientos humanos, localizados en su mayoría en zonas montañosas, áridas y llanuras costeras. El estado de San Luis Potosí se fundó a partir de la actividad minera, la cual ha contribuido como generadora de divisas a partir de la extracción de arcilla, bentonita, caliza, cobre, fluorita, oro, plata, plomo, sal, sílice, y zinc, no obstante, los procesos mineros y metalúrgicos son importantes liberadores de Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT), como lo son el arsénico (As), cadmio (Cd), cobre (Cu), estaño (Sb), mercurio (Hg), plomo (Pb) selenio (Se) y zinc (Zn), entre otros, que contribuyen significativamente en la contaminación de las matrices ambientales aire, agua superficial y subterránea, suelo y sedimento. Por esta razón, actualmente las compañías mineras son exhortadas a mejorar su desempeño ambiental, para así, reducir sus impactos ambientales (Razo, 2006; Servicio Geológico Mexicano, 2014; INE, 2007).

Desafortunadamente, en los sitios mineros históricos activos o inactivos se ha demostrado la presencia de EPT que pudiesen estar impactando la salud ecológica, es decir, que los componentes bióticos que forman un ecosistema muestran efectos en sus diferentes niveles de organización biológica, con posibles anomalías en su interacción entre especies y el sistema abiótico; pudiendo afectar las funciones generales del ecosistema. Recientemente, se ha establecido la legislación ambiental en países en desarrollo como México, desafortunadamente con carácter no retroactivo, lo cual complica la reparación de los daños causados por actividades del pasado (Razo, 2006).



1.1 PROBLEMÁTICA DE LOS SITIOS DE ESTUDIO

En el Panorama Minero del Estado de San Luis Potosí (2014), se menciona que este estado cuenta con 14 regiones mineras de donde destacan 13 distritos mineros y 23 zonas mineralizadas, dentro de los distritos mineros se hace mención de los distritos de Charcas y Cerro de San Pedro con alta importancia a partir de su potencial de minerales metálicos y no metálicos; sin embargo, su importancia en contenido de minerales es compartido con los impactos hacia el ecosistema que se pudieran generar durante las diferentes etapas de esta actividad, situación que se presenta de forma similar en Cedral y el distrito minero Villa de la Paz. Estos sitios mineros se relacionan por ser el resultado de la explotación de minerales de un mismo tipo de depósito minero, denominado skarn.

En el municipio de Cedral (Figura 1) no se encuentra ningún yacimiento minero; sin embargo, formó parte del sistema industrial minero-metalúrgico por contar con dos ex-haciendas de beneficio, «Jesús María» y «El Caballo», que actualmente se categorizan como pasivos ambientales históricos. En las haciendas molían la mena proveniente de las minas del municipio de Real de Catorce, se puede considerar que el uso de estas haciendas inició muy posteriormente a la apertura de las minas del municipio colindante, fecha que se estima alrededor de 1773. Anteriormente en estas haciendas se utilizaba el método de amalgamación con mercurio para beneficiar la plata, los residuos resultantes de las operaciones fueron jales mineros depositados en las mismas haciendas, estas haciendas se ubican en la cabecera municipal de Cedral (Flores-Ramírez *et al.*, 2012; Barrera, 2013).

El municipio Cerro de San Pedro (Figura 1) se ubica a 18 km hacia el Este de la capital de San Luis Potosí. Actualmente la cabecera municipal de este municipio se identifica como un sitio semi-despoblado, caracterizado por la actual etapa de abandono de las viviendas (Vargas-Hernández, 2009). La actividad minera en este municipio inició aproximadamente desde el año 1592, y desde esa fecha no se ha detenido el aprovechamiento de minerales (Servicio Geológico Mexicano, 2014). En este municipio, actualmente se asienta la unidad minera San Xavier, que opera

como mina a tajo o cielo abierto de donde se extrae la mena; es decir, el material que contiene los minerales oro y plata. El beneficio de los minerales se realiza a partir de un proceso de lixiviación en montones utilizando una solución de cianuro diluido para que de esta forma se obtenga el doré (mezcla oro-plata sin refinar), posteriormente se somete la solución concentrada en minerales metálicos a un proceso de recuperación por la técnica Merrill-Crowe, la cual consiste en separar los metales a través de la reacción cianuro-polvo de zinc, o por adsorción en carbono activado (Minera San Xavier SA de CV., 2010; PROESMIN, 2014). Según lo reportado por la empresa responsable de la mina San Xavier, la producción de oro y plata en el 2011 y 2012 fue de 137 555 y 1.9 millones de oz en producción anual respectivamente, donde hicieron uso de 5 460 ton anuales de cianuro sólido, 4 892 ton de nitrato de amonio y 258 ton de emulsión de nitrato de amonio anual (Newgold, 2012). Cabe señalar que el proceso de beneficio en la mina San Xavier es considerada como una actividad altamente riesgosa según la información recabada en el Análisis Detallado de Riesgo Nivel 3 de la Guía para la Presentación del Estudio de Riesgo Ambiental (ERA) y el Primer Listado de Actividades Altamente Riesgosas (Newgold, 2009). Por otra parte, se ha debatido sobre la contaminación atribuible a los residuos mineros a partir de la percolación de sustancias tóxicas hacia el agua superficial y subterránea (Reygadas & Reyna, 2008).

El municipio de Charcas (Figura 1) se localiza a 130 km al Norte de la ciudad de San Luis Potosí, su inicio en la actividad minera está registrado desde el año de 1574, conformando uno de los primeros sitios descubiertos en el país para la explotación mineral. Actualmente, dentro de sus límites municipales se ubican tres minas de extracción subterránea a más de 500 m de profundidad, con capacidad de 5 000 ton diarias de concentrado de oro, plata, plomo y zinc, la mena obtenida es triturada y molida en el sitio de extracción para posteriormente ser procesada en una planta de flotación y obtener los concentrados de minerales con interés económico; por último, el concentrado es enviado a las plantas de refinado (Suppen *et al.*, 2006; Estevis, 2008; H. Ayuntamiento de Charcas, 2013; Servicio Geológico Mexicano, 2014).



El municipio de Villa de la Paz (Figura 1) se localiza a 201 km al Norte de la ciudad de San Luis Potosí (Subdirección de Informática y Estadística, s/f) y aloja el distrito minero Santa María de la Paz ubicada en los municipios de Villa de la Paz y Matehuala, según el H. Ayuntamiento de Villa de la Paz se extrajeron minerales metálicos por primera vez en 1870 y 51 años después se fundó el municipio. Actualmente, la producción de minerales del yacimiento de este municipio es importante para el estado, con capacidad de 7 000 toneladas diarias de concentrado de Au, Ag y Cu (Servicio Geológico Mexicano, 2014). Los residuos resultantes, jales y terreros, depositados dentro del pueblo y sus alrededores, han propiciado la formación de óxidos de sulfuros (Noyola, 2006; Razo, 2006). Por otra parte, se ha demostrado que existe presencia de As en la orina y Pb en la sangre de niños y roedores de la zona contaminada, así como un daño significativo en el ácido desoxirribonucleico (ADN), resultando con concentraciones y daños mayores en comparación de los niños y roedores analizados en una zona de referencia (Jasso-Pineda *et al.*, 2007), así mismo, se ha demostrado la pérdida de biodiversidad en comunidades vegetales y animales de la zona minera (Espinosa-Reyes *et al.*, 2014).



Figura 1. Ubicación espacial de los sitios de estudio, a, Cedral; b, Villa de la Paz; c, Charcas; d, Cerro de San Pedro.

Los yacimientos minerales de donde se generan residuos sólidos de mina durante las etapas de minería y metalurgia que son depositados en los municipios con actividad minera histórica o reciente en Cedral, Cerro de San Pedro, Charcas y Villa de la Paz, como se mencionó anteriormente provienen del mismo tipo de

yacimiento geológico denominado skarn. Los depósitos minerales tipo skarn se conforman por granos gruesos de silicatos de calcio, hierro, magnesio y manganeso (Ca-Fe-Mg-Mn), formados por el reemplazamiento de rocas carbonatadas, acompañado por el metamorfismo de contacto y de una variedad de procesos metasomáticos, por esta razón se nombra a su ganga como calcosilicatos asociados a alguna mena de hierro. Las variaciones entre los tipos de skarn se deben a ciertas variables como el tipo de magma involucrado, profundidad del desplazamiento, potencial de Hidrógeno (pH), potencial redox (Eh), composición de la roca encajonante, entre otras. Los yacimientos de skarn han sido explotados por la variedad de elementos que contienen, y se pueden clasificar por (a) contener elemento económicamente dominante, (b) la composición de las rocas iniciales y, (c) su desarrollo como endoskarn y exoskarn (Villarreal, 2004; Vassallo, 2008).

A continuación se mencionan los depósitos minerales tipo skarn de donde provienen los residuos sólidos de mina depositados en los municipios antes mencionados, considerando la clasificación según el elemento económicamente dominante desde su descubrimiento. Los depósitos minerales con presencia o dominancia de oro (Au) se explotan en conjunto con otros elementos principales como el Cu, Zn, Pb, níquel (Ni), antimonio (Sb), en proporciones variadas; la mayoría de los depósitos skarn de Au se forman en rocas calcáreas con granate y piroxeno como silicatos dominantes en condiciones de oxidación y sulfuración. Los depósitos minerales con dominancia de Cu se relacionan con zonas epizonales, con intrusiones granodioritas y cuarzomonzonitas localizados en los márgenes continentales con alto contenido de granate y piroxeno, igualmente se asocian con ambientes oxidantes y cantidades de moderadas a altas en sulfuros. Los depósitos minerales con dominancia de Pb-Zn se pueden relacionar a vetas de plomo, zinc y plata (Pb-Zn-Ag), se forman en cinturones orogénicos con intrusiones granodioríticos y graníticos, con alto contenido de granate y piroxeno, en ambientes sulfurosos (Einaudi, 1981; Villarreal, 2004; Vassallo, 2008). Es importante identificar el tipo de yacimiento skarn para conocer los elementos dominantes y los posibles procesos de obtención de minerales de interés económico, así como la posible composición mineral de sus residuos.



Los principales residuos sólidos de mina son los terreros y los jales, generados por diferentes etapas de la industria minera (minado y concentrado), las características fisicoquímicas de cada residuo depende del tipo de yacimiento del que provienen, de los aditivos utilizados para la recuperación de minerales, las condiciones ambientales, entre otros. Estos residuos son considerados ganga, es decir, que posterior a la recuperación de minerales no tienen algún valor económico pese a que contienen una proporción residual de metales de interés, pero su recuperación no es redituable para la industria.

Los yacimientos de donde provienen los residuos de Cedral, Cerro de San Pedro, Charcas y Villa de la Paz son tipo skarn, por lo tanto contienen porciones de Ca-Fe-Mg-Mn, además de los elementos característicos al tipo de skarn específico (con dominancia de Au, Cu, Zn, Pb, Ni, Sb; con dominancia de Pb-Zn: Pb, Zn, Ag), y por ello, el material residual contienen compuestos que integran a estos elementos. Durante la etapa de exploración se generan residuos que consisten en vegetación y material sin ningún tipo de modificación distinto a la simple dinámica que conlleva la remoción y traslado; no obstante, en las otras etapas (Tabla 1) se generan residuos con diferentes niveles de modificación, alterando las propiedades originales del material removido, debido a la posible adición de químicos, minerales de ganga o aditivos orgánicos; además, pueden contener altas concentraciones de metales pesados como por ejemplo Cd, Cu, Hg, Pb y Zn, y el metaloide As (Monjezi *et al.*, 2009).

El terrero como el que se encuentra en Cerro de San Pedro, es un sitio donde se disponen montículos de suelo y roca estéril que desechan de la actividad minera en la etapa de minado por ser material mineral de baja ley que no tiene valor económico que sufrague su explotación. En esta etapa se realiza la remoción de suelo y rocas a partir del barrenado y voladura, resultando en residuos caracterizados por tener poca modificación en sus propiedades iniciales y diámetros de partícula gruesa; sin embargo, presentan compactación, declive en las actividades microbianas, pérdida tanto de las propiedades físicas del suelo como en la biodiversidad vegetal en el área de disposición, además de desplazamiento de la

fauna. Los terreros son depositados a cielo abierto por un tiempo indefinido y se ubican cerca de la mina de procedencia; en este depósito, los residuos se exponen a las condiciones ambientales, y durante su intemperismo existe el riesgo de producir drenaje ácido de roca, dispersión hídrica y eólica de los metales presentes en los residuos, dependiendo de las propiedades de la ganga depositada (Jiménez *et al.*, 2006; Lottermoser, 2007).

La presa de jales, como las que se encuentra en Villa de la Paz y Charcas, es el sitio donde se disponen los jales de mina, este material residual es generado en la actividad metalúrgica durante la etapa primaria de Concentrado de minerales (SEMARNAT, 2003). Este residuo sólido de mina se genera a partir del pre-concentrado, el cuál es sometido a la etapa de lixiviación o flotación para obtener una mayor concentración del metal de interés, partiendo de la disminución del tamaño de partícula y con ello aumentar la superficie de contacto para tener mayor eficiencia en la liberación de cada mineral. La minería puede utilizar la técnica de flotación, donde se agregan burbujas de aire y partículas minerales en un medio acuoso para favorecer el medio hidrofóbico y absorber las partículas de sulfuros (Duffield & May, 1998; Howard & Cameron, 1998; Dold, 2005; Lottermoser, 2007). La minería a cielo o tajo abierto acumula el residuo en grandes pilas para utilizar la técnica de lixiviación, a partir de rociar con una solución de agua y cianuro para producir intercambio de cationes en la arcilla que retiene a los metales; además, se añade a la solución un compuesto oxidante, obteniendo cambio de fase y valencia de los elementos, consiguiendo solubilizar a los metales de valor económico (Studies in Geophysics, 1998; Lottermoser, 2007); ambas operaciones pueden ser utilizadas para el mismo material. Este residuo se caracteriza por su alto nivel de modificación en las propiedades iniciales del material (suelo o roca) y es resultado de someter el material inicial a operaciones de hidrometalurgia, en donde puede adquirir componentes químicos y, aditivos orgánicos e inorgánicos, por lo tanto las características del residuo son variables; además, es influenciado por las condiciones ambientales a las que se expone en el área de disposición a cielo abierto (Jiménez *et al.*, 2006; Lottermoser, 2007). El volumen que ocupan los jales llega a ser considerablemente elevado pues entre el 30 y 90% de la masa del



yacimiento no es aprovechado; en México aproximadamente el 90% de la producción minero-metalúrgica da lugar a la producción de jales (Müezzinglu, 2003; Jiménez *et al.*, 2006).

El aprovechamiento de los yacimientos con minerales metálicos consiste en obtener mena; es decir, obtener rocas y material con altas concentraciones de elementos metálicos con valor económico. El agente lixiviante se prepara para la separación de minerales específicos, considerando la composición general del material que lo contiene, para ello, se realiza un estudio amplio que permita conocer estas características y así definir las propiedades químicas y las concentraciones del que se compondrá este agente. En las operaciones mineras recientes, se utilizan varios reactivos que normalmente pueden ser cianuro (CN), Cianuro de sodio (NaCN), Hidróxido de sodio (NaOH), tierra diatomácea, Zn, entre otros (Müezzinglu, 2003; Newgold, 2009). Una planta de Au genera jales que contiene Cianuro libre (CN⁻), complejos de CN con Zn, Ni, Cd, Cu, Fe, entre otros, y su oxidación produce amoníaco (NH₃), cianato (OCN⁻) y tiocianato (SCN⁻). Igualmente, en el proceso de recuperación de minerales metálicos se puede utilizar el Ácido clorhídrico (HCl) o el bromuro (Br⁻) en la solución lixiviante como alternativa del proceso de cianuración (Müezzinglu, 2003). El As puede ser liberado de minerales como la pirita y arsenopirita. También en algunas plantas o patios de beneficio se utilizaba el método de amalgamación con mercurio, por lo tanto es probable encontrarlo presente. Estos compuestos se encuentran presentes en los residuos y permanecen en las presas de jales o terreros donde pueden reaccionar y formar otras sustancias tóxicas para el ecosistema. Además, estos residuos proporcionan diminutas partículas sólidas suspendidas en el aire de diversa composición química que el aire puede transportar y extender por varios kilómetros. Se estima que 22 ton de gas de Ácido cianhídrico (HCN) son emitidos al ambiente al año, esto se calculó para plantas de 250,000 ton de capacidad para procesar minerales durante un año; se requiere 125 ton de CN por 750 kg de producción de Au y 167 kg de NaCN por kilogramo de Au (Müezzinglu, 2003).

Principales elementos potencialmente tóxicos (EPT)

La capacidad tóxica o Potencial Tóxico de cada EPT depende de su especie química, la cual determina la afinidad que tiene cada elemento para formar compuestos, lo cual puede atenuar su efecto o potencializarlo. En México se consideran EPT de mayor importancia ambiental al As, Ag, Ba, Be, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb, Se, Tl, V y Zn, porque al encontrarse biodisponibles pueden provocar efectos tóxicos sobre el organismo receptor (Volke *et al.*, 2005), por esta razón, la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 establece límites permisibles de concentración en suelo de metales y metaloides, a excepción del Cu y Zn.

- **Arsénico (As)**

El As es un metaloide y es liberado al ambiente por actividades humanas, entre ellas la fundición de rocas que contiene diversos minerales metálicos como el Au, Co, Ni, Pb y Zn. Su toxicidad depende de su forma, orgánica e inorgánica, su valencia, la solubilidad, estado físico y pureza, y de su tasa de absorción o eliminación. Se considera que la toxicidad de los compuestos del As siguen estos niveles de priorización (de mayor a menor): compuestos inorgánicos trivalentes, orgánicos trivalentes, inorgánicos pentavalentes, orgánico pentavalentes, y As elemental. En general el As inorgánico es más tóxico que el orgánico, igualmente se consideran más tóxicas las formas que se absorben más rápidamente, mientras que las que se eliminan con facilidad son menos tóxicas (Kelley *et al.*, 2002; ATSDR, 2009).

- **Cadmio (Cd)**

El Cd es un metal no esencial para el organismo, además es un elemento con potencial toxicológico que puede producir efectos adversos sobre los componentes de los ecosistemas por ser bioacumulable y tener una amplia dispersión hídrica y eólica. En la industria minera, el Cd es liberado durante la producción de otros metales por ser subproducto del tratamiento metalúrgico del Cu, Pb y Zn. Por su afinidad química se le encuentra junto al Zn, en proporción variable. El Cd en suelo puede ser encontrado en diferentes formas y rangos de solubilidad que va de



escasamente soluble (sulfuros), moderadamente solubles (sulfato de cadmio) a altamente solubles (carbonato de cadmio), el Cd^{+2} se absorbe moderadamente en la arcilla. El Cd induce a efectos tóxicos crónicos después de su ingesta (Kelley *et al.*, 2002) debido a que la acción tóxica del Cd se debe a su afinidad por los grupos sulfuro, hidroxilo, carboxilo, fosfatil, cisteinil e histidil, y su acción competitiva con otros elementos funcionalmente esenciales, Ca, Cu, Fe y Zn, sus principales interacciones son de unión fuerte con grupos -SH de las proteínas intracelulares, que inhiben a las enzimas que poseen estos grupos, también el desplazamiento del Zn de los enlaces -S- y la consiguiente alteración enzimática de sus procesos bioquímicos que se reflejan en su deficiencia relativa (Ramírez, 2002).

- **Cobre (Cu)**

El Cu es un metal que se encuentra de forma natural en el ambiente; sin embargo, cantidades adicionales de este elemento son liberados al ambiente por las actividades humanas, por ejemplo con la actividad minera en donde regularmente se encuentra como sulfuros insolubles y silicatos (Perwak *et al.*, 1980). Este elemento generalmente se adhiere a partículas de materia orgánica, por ser un mineral metálico no se degrada en el ambiente, pero sí puede distribuirse entre los componentes ambientales. La unión de elementos metálicos con compuestos orgánicos pequeños puede resultar en una mayor movilidad en el suelo (EPA, 1978).

- **Plomo (Pb)**

El Pb es un metal pesado que se encuentra de forma natural en la corteza terrestre, normalmente está combinado con otros elementos formando compuestos, igualmente, puede ser liberado de depósitos minerales de Ag, Pb-Zn y Zn. El Pb se adhiere a las partículas de suelo y permanece en la capa superior de este, es decir, en el edafón, en donde se encuentran los microorganismos formadores de suelo, se puede movilizar por el agua de lluvia, esta movilización dependerá del potencial de hidrógeno (pH) y otras características fisicoquímicas del suelo. El Pb no se degrada pero algunos de sus compuestos son transformados por la luz natural, el

aire y el agua. El Pb orgánico es absorbido a través de la dermis, su grado y tasa de ingesta de la absorción a través del tracto intestinal depende de las características individuales del organismo y del medio de ingesta. Los niveles de Pb en plantas y animales son más altos en sitios donde las matrices ambientales están contaminadas (Jasso-Pineda *et al.*, 2007; Espinosa-Reyes *et al.*, 2014).

- **Zinc (Zn)**

El Zn es uno de los elementos metálicos más comunes sobre la superficie de la tierra, este puede combinarse con otros elementos para formar compuestos de Zn, por ejemplo, en los sitios contaminados con este metal es común encontrar cloruro de zinc, óxido de zinc, sulfato de zinc y sulfuro de zinc. Este elemento y sus compuestos se adhieren a las partículas del suelo, sedimento y polvo en el aire, no se disuelve en agua pero puede transportarse a aguas subterráneas, arroyos y ríos, se puede acumular en peces y otros organismos (EPA, 2005).



1.2 JUSTIFICACIÓN

Desde el comienzo de la minería se le ha atribuido un valor ascendente a la actividad minera debido a la demanda social de minerales de interés económico; no obstante, durante las operaciones mineras se han realizado prácticas inadecuadas que resultan en daños hacia la salud de los diferentes componentes de los ecosistemas. Durante la etapa de operación, se extrae el material con representativa ley minera para la obtención de mena, dejando como residuo a los lixiviados, lodos, jales y terreros, estos residuos pueden contener concentraciones de metales pesados y metaloides potencialmente tóxicos para los ecosistemas. Los municipios de Cerro de San Pedro, Charcas y Villa de la Paz son sitios mineros del estado de San Luis Potosí, con importante producción de minerales en los últimos años, por otra parte, el municipio de Cedral tiene uno de los pasivos ambientales mineros más importantes del estado debido a que beneficiaba los minerales de las antiguas minas de Real de Catorce, minas de alta producción. Los residuos históricos y actuales que se localizan en estos sitios mineros, se han generado por industrias mineras antiguas o actuales que no le han dado un manejo adecuado a sus residuos. Actualmente se han documentado algunos efectos adversos sobre los ecosistemas. Para poder establecer si alguno de los componentes del ecosistema de los sitios mineros se encuentran en riesgo es primordial evaluar el potencial toxicológico de los residuos; una forma de realizar esta evaluación es a partir del uso de bioensayos y biomarcadores, los cuales permiten determinar el nivel de efecto a partir de respuestas biológicas en los organismos de prueba, estos organismos se caracterizan por su importancia ecológica en la matriz ambiental seleccionada y por ser ampliamente como organismo de prueba toxicológico, como la lombriz de tierra *E. andrei*. Con los resultados generados se aporta evidencia del potencial tóxico de los residuos sólidos de mina para la fauna edáfica, complementando los estudios de toxicidad que se han realizado en diferente medida para estos mismos sitios de estudio pero en diferentes escenarios ambientales, y así se contribuye a reunir evidencia suficiente para exhortar a las autoridades competentes a su intervención para disminuir el posible riesgo ecológico.

1.3 OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el potencial toxicológico de los residuos sólidos de mina, mediante el uso de bioensayos y biomarcadores en lombriz *Eisenia andrei* de diferentes sitios de San Luis Potosí.

Objetivos específicos

1. Cuantificar los metales y arsénico, así como medir las propiedades fisicoquímicas (CE y pH) en los residuos sólidos de mina y suelos de referencia.
2. Realizar bioensayos de letalidad y registrar la pérdida de peso en lombrices expuestas a residuos mineros, suelo de referencia y control negativo.
3. Realizar bioensayo de migración de lombrices de tierra *E. andrei* expuestas a residuos mineros, suelo de referencia y control negativo.
4. Evaluar la fragmentación del ADN en celomocitos de la lombriz *E. andrei* expuestas a residuos sólidos de mina, suelo de referencia y control negativo.
5. Integrar las evidencias para determinar el potencial tóxico de los residuos sólidos de mina.



1.4 EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA

La toxicología consiste en identificar y cuantificar los efectos adversos sobre organismos, provocados por estresores ambientales (Silbergeld, 1998), estos efectos se pueden clasificar según los sistemas o procesos orgánicos afectados, también se pueden asociar por los efectos sobre sus funciones biológicas.

Actualmente la toxicología es una ciencia ampliamente utilizada como herramienta para evaluar la salud del ecosistema (Silbergeld, 1998). La evaluación toxicológica es un análisis de los compuestos o agentes con potencial tóxico en donde se puede incluir la forma en que ingresa al organismo, la posible transformación después de ingresar al organismo y, los efectos relacionados con la sustancia y sus concentraciones (Wallace, 2007). Los bioensayos toxicológicos se utilizan para evaluar la toxicidad de los factores estresantes o contaminantes, estos son pruebas toxicológicas controladas para evaluar la respuesta biológica de un organismo expuesto a cualquier agente químico o físico, permitiendo medir cualitativamente o cuantitativamente su potencial tóxico (EPA, 1978), para estas pruebas se utilizan organismos de laboratorio para evaluar la respuesta biológica, como pueden ser la supervivencia y migración en exposición a metales pesados y metaloides; también se pueden realizar sobre biomarcadores de toxicidad (Silbergeld, 1998); los biomarcadores son un cambio en una respuesta biológica dentro de un sistema biológico y permiten evaluar experimentalmente su exposición a agentes contaminantes, estos cambios pueden ser bioquímicos, celulares, fisiológicos o de comportamiento que se pueden medir en tejido, fluidos corporales, a nivel organismo para proporcionar evidencia de la exposición o los efectos de los contaminantes (Shugart, 2000; Giulia-Lioneto, 2012), los efectos de los contaminantes en los niveles inferiores de la organización biológica (por ejemplo, bioquímico, celular, fisiológicas) en general se producen más rápidamente que en los niveles superiores (por ejemplo, efectos ecológicos) y por lo tanto puede proporcionar una alerta temprana más sensible de los efectos toxicológicos en los individuos de una poblaciones (Giulia-Lioneto, 2012).

Las pruebas de toxicidad nos permiten realizar la exposición controlada de organismos a sustancias puras o combinadas para evaluar su efecto. Una prueba de toxicidad usualmente mide la proporción de organismos afectados por su exposición (SCFI, 2010). Proporciona una respuesta generalizada sensible a los contaminantes que pueden integrar el efecto combinado de varios contaminantes presentes en el suelo (Giulia-Lioneto, 2012).

Los estudios toxicológicos para el análisis de riesgo ecológico, la caracterización de los residuos industriales, el registro de nuevos productos, la evaluación por emisiones, fugas, derrames y descargas, entre otras, requieren de procedimientos estandarizados para estimar los impactos que se ocasionan en los organismos y los ecosistemas. Los análisis fisicoquímicos deben ser complementados con pruebas toxicológicas en los estudios de sitios contaminados, como los bioensayos de toxicidad, para determinar los efectos sobre la biota, y con ello colaborar a la estimación de los posibles efectos sobre las funciones del ecosistema.

En Toxicología, un bioensayo o prueba de toxicidad es una técnica empleada para determinar si un compuesto o elemento está afectando aspectos como las funciones biológicas en animales y plantas, así como su interacción entre ellos, los cuales pueden hacerse notorios a nivel de supervivencia, reproducción, desarrollo, o a nivel genético, entre otros, y de esta forma se puede determinar el posible riesgo ambiental (Escalante, 2000). Los bioensayos se realizan considerando que los organismos probados son representativos de su ambiente natural (Colin, 1997). La información que aportan las mediciones fisicoquímicas y las pruebas biológicas permite generar una visión más completa sobre los efectos adversos que ocasionan los contaminantes sobre los componentes bióticos y abióticos de los ecosistemas, coadyuvando a determinar medidas integrales para proteger el ambiente.

Para evaluar el potencial tóxico que pueden generar algunos suelos o residuos se utilizan organismos de uno o varios niveles tróficos, en donde se debe priorizar el uso de animales detritívoros, productores, consumidores primario y consumidores secundarios, para obtener datos representativos a nivel ecológico.



Entre los organismos detritívoros se encuentran los anélidos terrestres o lombriz de tierra, que a su vez que son excelentes indicadores biológicos en pruebas de toxicidad por su directa exposición a suelos.

Las lombrices son ampliamente aceptadas para evaluar el potencial tóxico de suelos contaminados por actividades humanas, esto se debe a que la dermis de la lombriz representa una principal ruta de exposición por ser extremadamente permeable al agua, permitiendo que los metales disueltos en la fase acuosa del suelo estén en contacto con su dermis, al igual que ingieren grandes cantidades de suelo que le permite estar constantemente expuestas a absorber los contaminantes de las partículas del suelo a través del tracto alimenticio (Giulia-Lioneto *et al.*, 2012). Lukkari *et al.* (2004) y Suthar *et al.*, (2008) realizaron pruebas de toxicidad con lombrices expuestas a suelos contaminados con metales, demostrando que las lombrices son susceptibles a los contaminantes del suelo por lo tanto son eficaces bioindicadores de la calidad del suelo.

1.5 LOMBRIZ DE TIERRA (*E. andrei*)

Estas lombrices pertenecen al género de los anélidos terrestres, a la clase de los *Clitelados*, al orden de los *Oligoquetos* y a la familia de los *Lombrícidos* (Compagnoni & Putzolu, 1995). También son conocidas comúnmente con el nombre de lombrices rojas californianas.

Ramírez (2005), Reines y col. (1998) y Compagnoni & Putzolu (1995) las identifican como anélidos hermafroditas, por estar dotadas de órganos masculinos y femeninos; pero son incapaces de auto-fecundarse debido a que el órgano masculino madura antes que el femenino (mecanismo proterandria). La *E. andrei* se reproduce por fecundación cruzada; ambas se acoplan en un lazo estrecho y en posición invertida respecto a sus órganos sexuales, permaneciendo inmóvil hasta un cuarto de hora. Durante el apareamiento intercambian espermatozoos (espermas), los cuales, quedan depositados en una envoltura viscosa denominada *clitelo* o epitelio glandular (faja translúcida). Las huevas fecundas oscilan de 4 a 20, conteniéndose en una cápsula que abrirá en tres semanas, esta alcanzara la

madurez sexual a los tres meses y a partir de entonces se pueden aparear en intervalos mínimos de siete días (Figura 2). En promedio viven 16 años en condiciones naturales (Compagnoni & Putzolu, 1995).

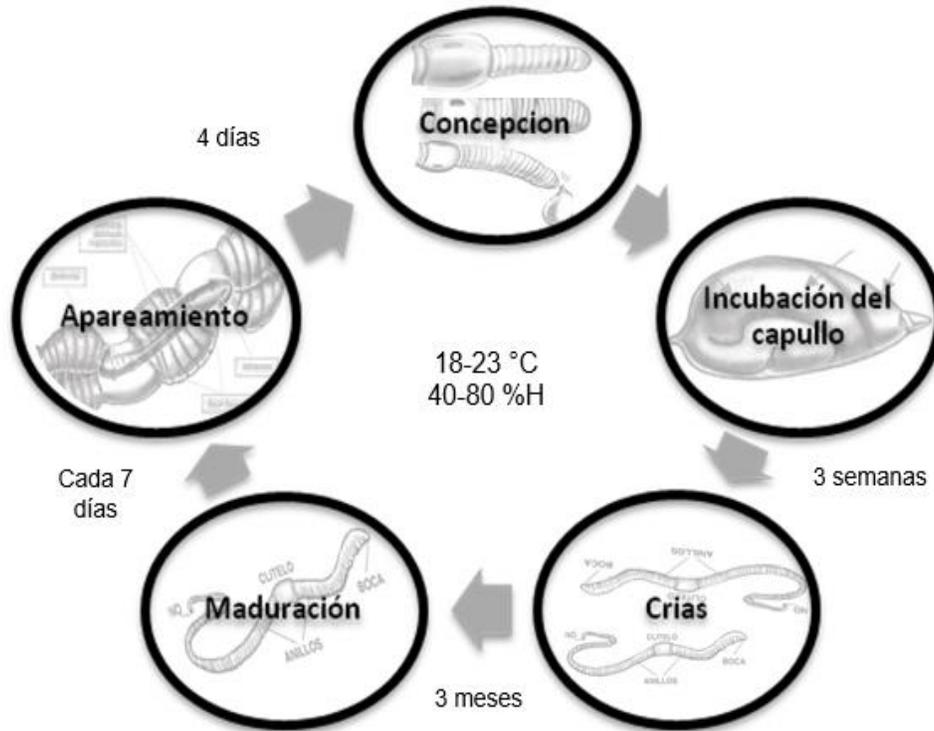


Figura 2. Ciclo vida de la lombriz *E. andrei*.

Este organismo se caracteriza por estar revestido por una fina cutícula que permite su respiración, su cuerpo es cilíndrico y se constituye por anillos que forman segmentos a lo largo de su cuerpo, su longitud varía entre 6 y 10 cm en etapa adulta, además están dotadas de seis riñones y cinco corazones. En la extremidad anterior, el prostomio (Figura 3) se encuentra grupos de células que pueden percibir el grado de acidez o alcalinidad del suelo, así como los estímulos luminosos que pueden llegar a irritarla (Compagnoni & Putzolu, 1995).

Las lombrices se desplazan a partir de su sistema de locomoción que realiza movimientos en donde un grupo de metámeros se alarga y se desplaza hacia adelante mientras el grupo contiguo se dilata y contrae. El cuerpo de la lombriz está constituido por el 70-80% de agua, el resto es materia seca, contiene hasta el 65%

de proteínas y aproximadamente el 10% de grasas. La lombriz no puede ver, pero posee un sentido del tacto muy desarrollado debido a un gran número de células sensoriales (Compagnoni & Putzolu, 1995).

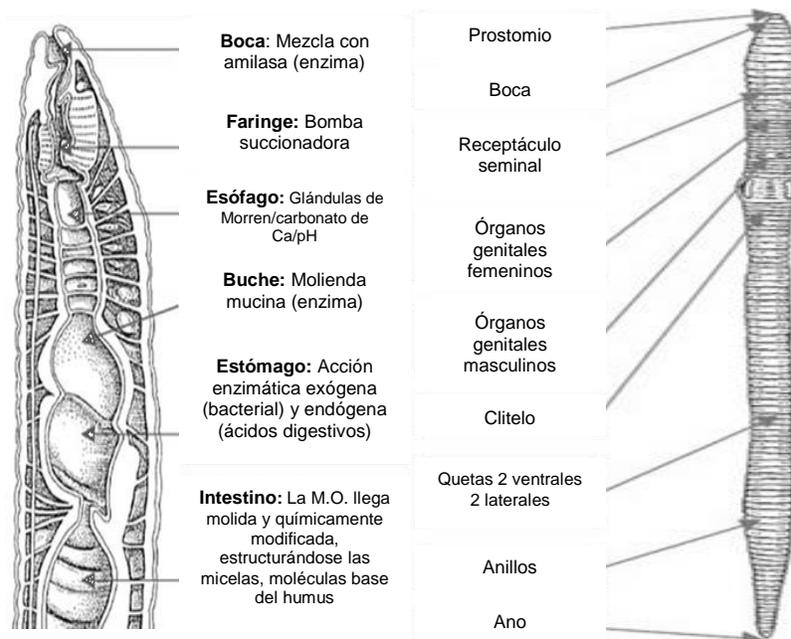


Figura 3. Sistema digestivo de la lombriz y su fisiología principal. Recuperado de Compagnoni & Putzolu, 1995.

El sistema digestivo de las lombrices está constituido por el tubo digestivo (compuesto por cavidad bucal, faringe, esófago + glándulas calcíferas, buche, molleja, intestino + tiflosol hasta el ano) que se sitúa a lo largo de todo su cuerpo, como se muestra en la Figura 3. Estos organismos hacen pasar su alimento (materia orgánica) a través de la boca que se comunica con la faringe, la cual funciona como bomba de succión, y por acción glandular se producen secreciones proteolíticas que humedecen los alimentos que pasarán al esófago y de ahí al buche (cámara amplia de almacenamiento), para así, llegar a la molleja (cámara con gruesas paredes musculares) que es donde se tritura la ingesta con ayuda de los granos de arena también ingeridos. Las glándulas calcíferas se asocian al esófago, cuya función está relacionada con el mantenimiento de un grado de acidez óptimo en los líquidos corporales del anélido. Estas glándulas son las encargadas de regular el exceso de calcio en la sangre debido al alto consumo de calcio proveniente de la materia

orgánica. Después pasa al intestino, que se constituye internamente por tejido epitelial rico en células glandulares y tiflosol (pliegue interno absorbente), alrededor de la pared del intestino hay una capa de células cloragógenas (síntesis y almacenamiento de glucógenos y grasas, desaminación de proteínas, etc.). Al igual, posee una flora microbiana constituida por cerca de 500 mil millones de microorganismos (Reines *et al.*, 1998; Bollo, 1999). El intestino tiene secreciones ricas en enzimas que desdoblan los carbohidratos, proteínas y grasas. Al final del intestino, los restos orgánicos que no fueron digeridos ni asimilados (partículas minerales y rica carga microbiana) obtenidos por su prolongada actividad recicladora, son expelidos en forma de compuestos orgánicos ricos en nutrientes de fácil asimilación por las plantas (humus, *casting*, *lombricomposta* o abono orgánico) (Reines *et al.*, 1998; Ramírez, 2005).

Desde el momento de su nacimiento, las lombrices comen solas y sólo necesitan para sobrevivir que el sustrato donde se encuentran sea lo suficientemente húmedo para ser perforado por su minúscula boca. Bruckman y Brandy (1993) hacen alusión a que la cantidad de suelo que estos organismos hacen pasar por sus cuerpos, para posteriormente transformarlo en humus; anualmente puede sobrepasar las 37 toneladas de tierra seca por hectárea cultivada. Además, llevan a cabo un notable transporte de suelo desde las capas inferiores a la superficie, aumentando así la estabilidad de los agregados del suelo.

Durán y Henríquez (2007) mencionan que el humus de lombriz está compuesto por carbono (C), oxígeno (O), nitrógeno (N), así como de micro y macro nutrientes en diferentes proporciones; en los estudios que realizaron reportan que este contiene de entre 1.8% de N, 1.6 a 5.6% de Ca, 0.3 a 0.8% de Mg, 0.8 a 6.8% de K, 1.3 a 2% de P, 29 a 37.1% de materia orgánica, 16.9 a 21.6% de CO, 5.6 a 10.9 de C/N, y de entre 5461 a 26489 mg Kg⁻¹ de hierro (Fe), 47 a 105 mg Kg⁻¹ de Cu, 181 a 1118 mg Kg⁻¹ de Zn, 218 a 700 mg Kg⁻¹ de Manganeseo (Mn), utilizando como materia orgánica los residuos domésticos, estiércol, plátano, plantas ornamentales o broza. Este desechos procesados por las lombrices (humus) tienen un pH de entre 6.9 a 9 y mayor cantidad de nitrógeno en forma de nitratos mejorando



así la fertilidad química del suelo, en comparación con la composta ordinaria; y una salinidad de entre 0.3 a 1.5 mS cm⁻¹ (Lara & *et al.*, 1998; Durán & Henríquez, 2007).

1.6 CARACTERÍSTICAS AMBIENTALES

Las lombrices se desarrollan apropiadamente si se cumplen las siguientes características ambientales:

Humedad

Las lombrices toman su alimento succionándolo, por lo tanto, la humedad es importante para facilitar la ingestión de alimento, si no existe una humedad adecuada, la operación no se puede llevar a cabo, también es necesaria para el deslizamiento a través del material; por ello esta debe mantenerse entre el 70 y 80%, arriba del 85% afecta la producción y abajo del 70% se presentan condiciones desfavorables hasta llegar a condiciones de humedad que pueden provocar la muerte (Lara & *et al.*, 2003).

Temperatura

Es uno de los factores que influye en la reproducción, producción de humus y fecundidad de los cocones. Una temperatura entre 18 a 24° C es considerada óptima y conlleva al máximo rendimiento de las lombrices. A temperaturas inferiores de 16° C, no se reproducen y temperaturas superiores a 32° C, también resultan inapropiadas (Santamaría & Ferrera, 2002; Lara & *et al.*, 2003).

Potencial de hidrógeno (pH)

La lombriz acepta sustratos con pH de 5.0 a 8.4, fuera de esta escala la lombriz entra en una etapa de latencia. Con pH ácido del sustrato, puede desarrollarse con una plaga conocida como la *Platyhelminthes* (Lara & *et al.*, 2003). Santamaría y Ferrera-Cerrato (2002) reportan que la *Eisenia a* tiene capacidad de soportar condiciones de pH inferiores de 9.5, pero cuando este es mayor a 9.7 las lombrices mueren.

Contenido de sales

La cantidad de sales disueltas, representadas por conductividad eléctrica (CE), es otro factor que determina el desarrollo de las lombrices, al aumentar la CE las lombrices son afectadas, cuando la CE está entre 8 y 10 mS cm⁻¹, las lombrices detienen su desarrollo y arriba de esta CE mueren (Santamaría & Ferrera, 2002).

1.7 BIOENSAYO CON LOMBRIZ DE TIERRA

Moreira (2009) manifiesta que los bioensayos permiten evaluar la biodisponibilidad de los contaminantes y sus subproductos de degradación, y se proponen como complemento de los análisis químicos para monitorear el impacto de la contaminación. Pese al resultado que se obtenga con los bioensayos, no se puede generalizar para toda situación, debido a las particularidades de cada taxón y ecosistema (Ramírez, 2005).

Los organismos de prueba basados en la fauna del suelo, presentan sensibilidad a las perturbaciones del medio; el hecho de que puedan integrar procesos físicos, químicos y biológicos son atributos que permiten su utilización como indicador de la calidad del suelo de forma rápida y sensitiva. Estos indicadores tienen la capacidad para funcionar dentro de los límites del ecosistema, para sostener la productividad biológica, mantener la calidad ambiental y promover la salud de plantas, animales y del hombre (Doran & Parkin, 1994). La calidad del suelo puede determinarse de la siguiente forma, según aportaciones de Abbott y Murphy (2003); en donde se hace notar la importancia de las lombrices de tierra para determinar la calidad del suelo a partir de descomponer la materia orgánica:

- Calidad física: favorece las fases del suelo (aire, agua y sólido) en proporciones óptimas para el desarrollo de otros seres vivos edáficos.
- Calidad química: favorecen los ciclos biogeoquímicos de algunos elementos como del nitrógeno.
- Calidad biológica: proporciona nutrientes al suelo para ser asimilados por otros seres vivos, favoreciendo de forma directa o indirecta su desarrollo,



como el aumento de la masa microbiológica estimulada por la fertilización de amplias áreas del suelo.

Los organismos de prueba que naturalmente forman parte de la fauna del suelo son partícipes para determinar la calidad del mismo, a través de ellos se puede cuantificar los impactos de las prácticas antropogénicas, esto es posible al evaluar las comunidades biológicas de los mismos, este nivel de organización permite integrar interacciones de todos los factores del suelo, incluyendo la contaminación. Sin embargo, en los niveles altos de organización ecológico es complicado hacer mediciones representativas, debido a que las respuestas biológicas son más lentas y su interpretación más compleja, por esta razón es mayormente común obtener medidas a nivel de organización inferiores a población (Moreira, 2009).

La calidad del suelo indica que éste tiene la capacidad para funcionar dentro de los ecosistemas, sostener la productividad biológica, mantener la calidad ambiental y promover la salud de las plantas, de los animales y del hombre. Los organismos de prueba, como la *E. andrei*, son los encargados de cuantificar esta calidad del suelo en su medio natural (Moreira, 2009); Neuhauser *et al.* (1985) describieron estas lombrices como las herramientas del suelo como biomonitores del ecosistema. Entre los requisitos que deben cumplir los indicadores se encuentran:

- Sensibilidad a los cambios en el suelo que ocurren como resultado de la degradación antropogénica.
- Elevada correlación con el ecosistema.
- Integración de datos (contaminante-efecto).
- Tener bajo costo.
- Proporcionar una respuesta corta en el tiempo (semanas-meses).

- Obtener resultados fáciles de interpretar.

Por lo anterior, la *E. andrei* son utilizadas para medir la calidad del suelo a partir de bioensayos. La *E. andrei* es utilizada en pruebas toxicológicas, por su facilidad de multiplicación en laboratorio, por su corto tiempos de generación, por manifestar gran sensibilidad sobre la contaminación del suelo y ser sustentable en el costo-beneficio (Moreira, 2009; Ramírez, 2005).

La exposición de las lombrices a suelos y sedimentos contaminados produce el contacto directo con su epidermis, lo que ocasiona un daño dérmico o la absorción de tóxicos por esta vía, al grado de provocar la muerte. La mortalidad en estos organismos es determinada por la falta de movimiento en respuesta a estímulos táctiles definidos en su porción final. Otro aspecto con el que se determina la condición de muerte es la tendencia a la desintegración rápida, pudiendo quedar una mancha amarilla como vestigio de la presencia del organismo. Los síntomas patológicos previos son las lesiones superficiales y la hinchazón de la porción de inter-segmentos o áreas ulceradas en la epidermis (Linares *et al.*, 2006).

1.8 BIOMARCADOR EN LOMBRIZ DE TIERRA

A partir de los bioensayos de toxicidad se pueden derivar los biomarcadores de toxicidad, los cuales puede ofrecer más información acerca de la respuesta de estrés del organismo a sustancias tóxicas individuales y mezclas. Entre los biomarcadores de toxicidad están la medición de acetilcolinesterasa, la metalotioneína, enzimas de biotransformación y las defensas antioxidantes, al igual que mediciones como del daño al ADN; mismas mediciones que se pueden hacer en: (i) lombrices nativas; (ii) organismos introducidos a contaminación *in situ*; (iii) lombrices nativas llevadas a condiciones de laboratorio; (iv) estudios de campo simulados con lombrices criadas en cautiverio (Giulia-Lioneto, 2012).

Los biomarcadores que utilizan lombrices criadas y son expuestas a estudios de campo simulados permiten obtener un protocolo estandarizado debido a que se controlan todas las condiciones, mismas que pueden ser replicadas con mayor

facilidad, para proporcionar evidencia de la relación causa-efecto entre los contaminantes del suelo y los efectos tóxicos en los individuos. Los biomarcadores pueden dar una contribución en bioensayos agudos como efectos sub-letales (Giulia-Lioneto, 2012).

El daño del ADN puede resultar en graves consecuencias para los individuos y especies, se considera como un indicador importante para ser utilizado en la evaluación de la salud de las lombrices. La electroforesis en gel de célula única (o ensayo cometa) y el ensayo de micronúcleos son dos métodos utilizados más ampliamente en la detección de genotoxicidad de factores estresantes en el ambiente. El ensayo cometa mide el daño del ADN en las células individuales, provocado por la formación de sitios lábiles-álcali; en las lombrices este daño se determina en los celomocitos (células de lombriz) que a su vez se encuentran en el fluido celómico, el cual puede transportar contaminantes en todo el organismo y sus células. El celomocito están involucrado en el sistema de defensa interna y se compone por amebocitos procedentes de revestimiento mesenquimales del celoma (Figura 4) y eleocitos (cloragocitos) desprendidos en el líquido celómico de los tejidos cloragógeno que rodea el intestino y los vasos sanguíneos (Giulia-Lioneto, 2012).

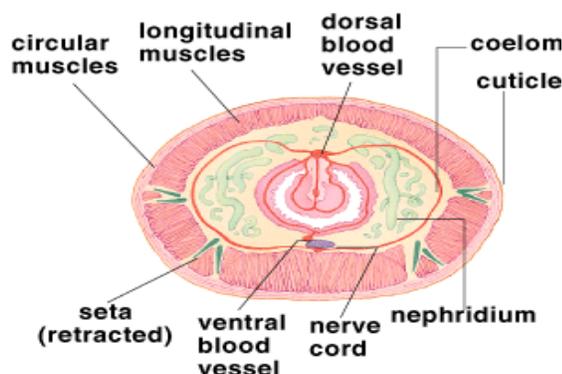


Figura 4. Corte histológico del cuerpo de la lombriz (sección transversal) para identificar el celoma, recuperado de <http://faculty.southwest.tn.edu/jwilliams/earthworm.htm>

Existen cinco tipos de células en el fluido celómico, correspondientes a los tipos de células celómicas anteriormente descritas: eucocitos de tipo I (basófilo) y II (acidófilo), granulocitos, neutrófilos, y eleocitos. Los eleocitos se caracterizan por la presencia de gránulos con una alta auto-fluorescencia derivado de riboflavina y de otros fluoróforos (Giulia-Lioneto, 2012), lo que permite ser utilizadas para la evaluación de genotoxicidad en el ensayo cometa.

1.9 EFECTOS TOXICOLÓGICOS POR METALES Y ARSÉNICO

Las lombrices que ingieren suelos con metales pesados, estos se les acumulan principalmente en el canal alimentario posterior. Esta parte del cuerpo incluye el intestino y los tejidos cloragógenos que separa los epitelios de absorción de la cavidad celómica. El tejido cloragógeno se compone de células pedunculadas y sus funciones principales son la síntesis de la hemoglobina, la homeostasis de la composición de cationes en la sangre y el líquido celómico, el mantenimiento de un nivel de pH equilibrado, el almacenamiento de nutrientes y residuos, y la absorción y la desintoxicación de cationes tóxicos. Los metales pesados interfirieron con una amplia gama de funciones metabólicas y los mecanismos de transporte de membrana, igualmente pueden alterar tanto la estructura y la integridad de ADN (Giulia-Lioneto, 2012).

Se estima que la dosis de Cd que ingresa al organismo puede corresponder entre el 1 al 10 por ingesta y menos del 1% de forma dermal. En las células, el Cd se une a la metalotioneína, la cual es su medio de transporte (Ramírez, 2002; ATSDR, 2012). El As puede adherirse a la dermis y al intestino de la lombriz de tierra sin ningún tipo de metilación biológica vía oral (Langdon, *et al.*, 2003). El Cu no se ha demostrado de forma contundente su acumulación en tejido de lombriz. Por otra parte, la exposición a Pb al igual que en los demás metales, aumenta su movilidad con la disminución del pH en el suelo, favoreciendo la mortalidad de la lombriz. La morfología del esperma es modificada en suelos contaminados con Pb, al igual que se puede alterar la homeostasis hormonal. Gran parte del Pb en la lombriz se encuentra en fracción granular (60% aproximadamente) pero no

necesariamente está disponible para sus depredadores, mientras que el resto se encuentra en tejido, membrana celular y en fracciones de células. La EPA menciona que existe evidencia que asociada al daño del ADN por exposición a Pb en lombriz de tierra (EPA, 2013).

1.10 ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA

En el presente diagrama de flujo (Figura 5), se representa gráficamente la sucesión de actividades realizadas e información generada, durante el desarrollo metodológico para establecer el potencial tóxico de los residuos sólidos de mina, integrando muestras de suelo y sustratos controles; de esta forma se obtuvieron resultados comparativos y confiables.

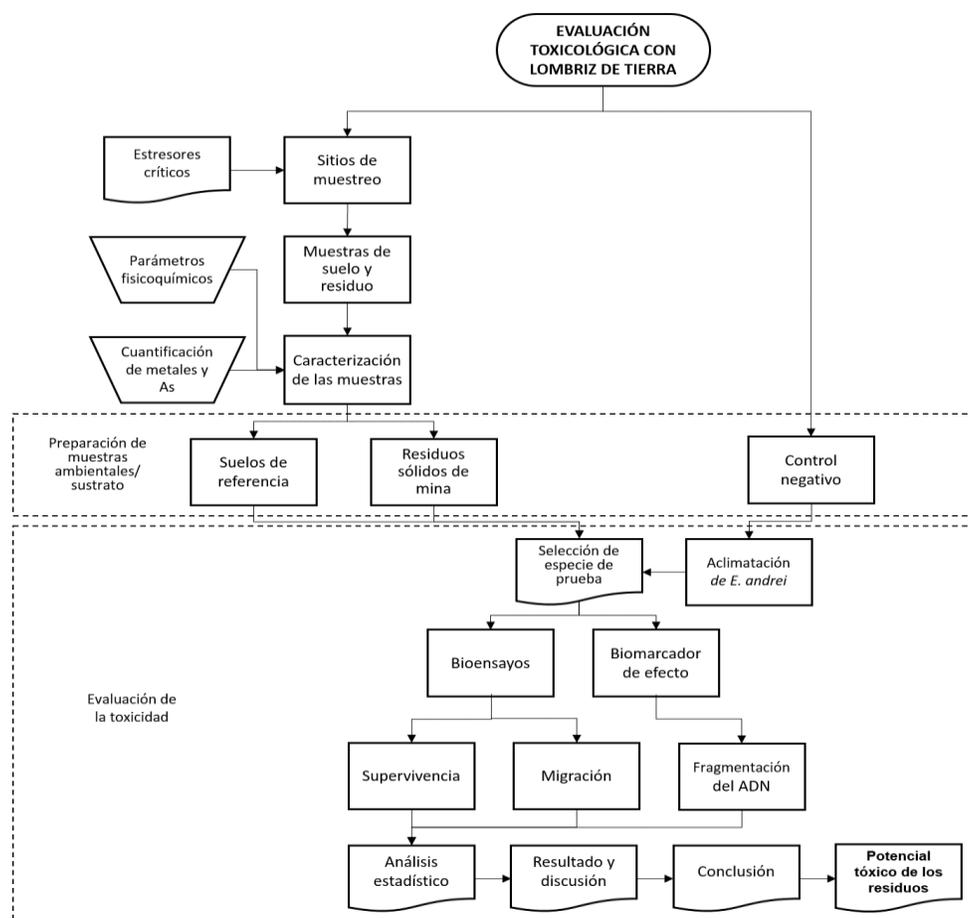


Figura 5. Diagrama de flujo para describir la metodología.

1.11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott L. K., Murphy D. V. (2003). What is soil biological fertility?, in: Abbott L. K. and Murphy D. V. (Eds), Soil biological fertility: a key to sustainable land use in agriculture. *Kluwer Academic Publishers*, 1-15.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2009). *La toxicidad del arsénico*. Estudio de caso en medicina ambiental (CSEM), p.110.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2012). *Toxicological profile for cadmium*. Atlanta, Georgia.
- Barrera, G. T. (2013). El paisaje de Real de Catorce: un despojo histórico. *Boletín del Instituto de Geografía*, 110-125.
- Bollo, E. (1999). *Lombricultura: una alternativa de reciclaje*. Quito. Soboc Grafic.
- Collins, A. R., Dobson, V. L., Dušinská, M., Kennedy, G., & Štětina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us?. *Mutation research*, 375, 183-193.
- Buckman, H. O., y Brandy, N. C. (1993). *Naturaleza y propiedades de los suelos*. Limusa, S. A. de C. V.
- Compagnoni, G., & Putzolu, L. (1995). *Cría moderna de lombrices y utilización rentable del humus*. Barcelona: De Vecchi, S. A., p.120.
- Dold, B. (2005). Basic Concepts of Environmental Geochemistry of Sulfide Mine-Waste. *XXIV Curso Latinoamericano de Metalogenia*. UNESCO-SEG, p. 36.
- Duffield, J., & May, P. (1998). Best practice environmental management in mining: Cyanide management. *Environmental Australia*, p. 148.
- Durán, L., & Henríquez, C. (2009). Crecimiento y reproducción de la lombriz roja (*Eisenia foetida*) en cinco sustratos orgánicos. *Agronomía Costarricense*, 33(2): 275-281.



- Einaudi, M. T., Meinert, L. D., & Newberry, R.J. (1981). Skarn deposits: economic geology. *75th Anniversary*, p. 317-391.
- Environmental Protection Agency (EPA). (1978). *Training manual: Bioassay for toxic and hazardous materials*. United States.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2005). *Toxicological review: zinc and compounds*. Washington, DC.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2013). *Final Report: Integrated Science Assessment for Lead*. U.S. Washington, DC.
- Escalante E. E. (2000). *Estudio de ecotoxicidad de suelo contaminado con hidrocarburos*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D. F.
- Espinosa-Reyes, G., Gonzáles-Mille, D. J., Ilizaliturri-Hernández, C. A., Mejía-Saavedra, J., Cilia-López, V. G., Costilla-Salazar, R., & Díaz-Barriga, F. (2014). Effect of mining activities in biotic communities of Villa de la Paz, San Luis Potosi, Mexico. *BioMed Research International*, 13. México.
- Estevis, A. J. M. (2008). *El ascenso como ideología en una familia minera de Charcas, San Luis Potosí*. Tesis de Maestría. Colegio de San Luis, México.
- Flores-Ramírez, R.; Rico-Escobar, E.; Núñez-Monreal, J.; García-Nieto, E.; Carrizales, L.; Ilizaliturri-Hernández, C.; & Díaz-Barriga F. (2012). Exposición infantil al plomo en sitios contaminados. *Salud Pública de México*, 54(4), 383-392.
- H. Ayuntamiento de Charcas. (2013). Plan de desarrollo municipal 2012-2015. *Periódico Oficial del Estado Libre y Soberano de San Luis Potosí*.
- Howard, B., & Cameron, I. (1998). Best practice environmental management in mining: Dust control. *Environmental Australia*. Pp. 45.

- Giulia-Lioneto, M., Calisi, A., & Schettino, T. (2012). *Earthworm Biomarkers as Tools for Soil Pollution Assessment*. En *Soil health and land use management*. Belgium: InTech, p.332.
- Hartman, H. L., & Mutmansky, J. M. (2002). *Introductory mining engineering*. New Delhi: Wiley-India.
- Instituto Nacional de Ecología (INE). (2007). *Industria minera: importancia de la minería en México*. Recuperado de <http://www.inecc.gob.mx/>
- Jasso-Pineda, Y., Espinosa-Reyes, G., Gonzáles-Mille, D., Razo-Soto, I., Carrizales, L., Torres-Dosal, a., Mejía-Saavedra, J., Monroy, M., Irina, I. A., Yarto, M., & Díaz-Barriga, F. (2007). An integrated health risk assessment approach to the study of mining sites contaminated with arsenic and lead. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3(3), 344–350.
- Jiménez, C., Huante, P., & Rincón, E. (2006). *Restauración de minas superficiales en México*. Instituto de Ecología UNAM - Secretaría de Recursos Naturales. Ciudad de México, p.83.
- Kelley, M. E., Brauning, S. E., Schoof, R. S., & Ruby, M. V. (2002). *Assessing oral bioavailability of metals in soil*. Columbus, Ohio, p.124.
- Lara, H. A., Dueñas, G. A., Zelaya, L. H., Quintero, R. L., Avelar, J. J. M., & Llamas, J. (2003). Naturaleza de materiales orgánicos y población de lombrices en vermicomposteo. *VII Jornadas de investigación*. Universidad Autónoma de Zacatecas.
- Langdon, C. J., Pierce, T. G., Meharg, A. A., & Semple, K. T. (2003). Interaction between earthworms and arsenic in the soil environmental: a review. *Environmental Pollution*, 3(124), 361-373.
- Linares, L. C. F., Avelizapa, N. G. R., Carrillo, T. G. R., Islas, M. E. R., Martínez, H. G. Z., & Hernández. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicada a la remediación de sitios contaminados*. SEMARNAT, INE, IMP.



- Lottermoser, B. G. (2007). *Mine wastes: characterization, treatment, environmental impacts*. Australia: Springer.
- Lukkari, T., Taavitsainen, M., Väisänen, A., & Haimi, J. (2004). Effects of heavy metal on earthworms along contamination gradients in organic rich soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, 340-348.
- Minera San Xavier SA de CV. (2010). *Manifiesto de impacto ambiental*. 2014, de CEASSA-UASLP Sitio web: <http://sinat.semarnat.gob.mx/dgiraDocs/documentos/slp/resumenes/2010/24/SL2010M0011.pdf>
- Monjezi, M., Shahriar, K., Dehghani, H., & Samimi N. F. (2009). Environmental impact assessment of open pit mining in Iran. *Environ Geol.* 58, 205–216.
- Moreira, M. M. (2009). *Aplicación y selección de indicadores de calidad ecológica a la utilización de fertilizantes orgánicos para la producción de forraje*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, p.175.
- Müezziniğlu, A. (2003). A review of environmental considerations on gold mining and production. *Critical Review of Environmental Science and Technology*, 33(1):45-71.
- Neuhauser, E. F., Loehr, R. C., Malecki, M. R., Milligan, D. L., y Durkin, P. R. (1985). The toxicity of selected organic chemicals to the earthworm *Eisenia fetida*. *J. Environ. Qual.*, 14(3), 383-388.
- Newgold. (2009). *Manifiesto de impacto ambiental modalidad regional unidad minera Cerro de San Pedro: operación y desarrollo*, p.552.
- Newgold. (2013). *Resumen del reporte de sustentabilidad del 2013*, p. 28.
- Norma Oficial Mexicana *NOM-141-SEMARNAT-2003, Que establece el procedimiento para caracterizar los jales, así como las especificaciones y*

criterios para la caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción, operación y post-operación de presas de jales.

Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, *Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio.*

Noyola, C. R. (2006). *Escenarios para la gestión ambiental: la zona minera de Villa de la Paz – Matehuala, S. L. P.* Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México.

Perwak, J., Bysshe, S., & Goyer, M. (1980). *An exposure and risk assessment for copper.* Washington, DC: EPA. EPA-440/4-81-015.

PROESMIN S.A.C. (2014). *Manual de minería.* 2014, de PROESMIN S.A.C. Sitio web: <http://www.proesmin.com/main/es>

Ramírez, G. (2005). *Ecología aplicada. Diseño y análisis estadístico. Colección estudios de Ecología.* Universidad de Bogotá.

Ramírez, P. R., & Mendoza, C. A. (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas del agua y suelo. La experiencia en México.* INE-SEMARNAT, México, D. F., p. 233-273.

Razo, S. I. (2006). *Identificación de áreas prioritarias de restauración de suelos contaminados por arsénico y metales pesados en el sitio minero y metalúrgico de Villa de la Paz - Matehuala, S. L. P. (México).* Tesis de Doctorado. UASLP, San Luis Potosí, México.

Reines, Á. M., Rodríguez, A. C., Sierra, P. A., & Vázquez G. M. M. (1998). *Lombrices de tierra con valor comercial: Biología y técnicas de cultivo,* p. 60.



- Reygadas, P., & Reyna, J. O. F. (2008). La batalla por San Luis: ¿el agua o el oro? La disputa argumentativa contra la Minera San Xavier. *Estudios Demográficos y Urbanos*, 23(2), 299 – 331.
- Santamaría, S., & Ferrera-Cerratos, R. (2002). *Dinámica poblacional de Eisenia andrei en diferentes residuos orgánicos*. Recuperado de: <http://www.chapingo.mx/terra/contenido/20/3/art303-310pdf>.
- Secretaría de Comercio y Fomento a la Industria NMX-AA-087-SCFI-2010, *análisis de agua: evaluación de la toxicidad aguda con Daphia magna, Straus (Crustacea-Cladocera)-métodos de prueba*.
- Servicio Geológico Mexicano. (2014). *Panorama minero del estado de San Luis Potosí*. 2014, de Secretaría de Economía. Recuperado de http://www.sgm.gob.mx/pdfs/SAN_LUIS_POTOSI.pdf
- Shugart, L. R. (2000). DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology*, 9, 329-340.
- Silbergeld, K. E. (1998). Toxicología: herramientas y enfoques. En S. J. Marger (Ed.), *Enciclopedia de la salud y seguridad en el trabajo*. Ginebra: OIT, p.33-116.
- Studies in geophysics. (1984). Groundwater contamination. *National Academics Library*. Whashington, D. C., p. 179.
- Subdirección de Informática y Estadística. (S.f.). *Monografías de los municipios de México*. Gobierno de San Luis Potosí 2012-2015. Coordinación Estatal para el Fortalecimiento Institucional de los Municipios.
- Suppen, N., Carranza, M., Huerta, M., & Hernández, M. A. (2006). Environmental management and life cycle approaches in the Mexican mining industry. *Journal of Cleaner Production*, 14, 1101-1115.

- Suthar, S., Singh, S., & Dhawan, S. (2008). Earthworms as bioindicator of metals (Zn, Fe, Mn, Cu, Pb and Cd) in soil: Is metal bioaccumulation affected by their ecological category?. *Ecological engineering*, 32, 99-107.
- Vargas-Hernández, J.G. (2009). Cooperación y conflicto entre empresas, comunidades y gobierno: nuevos movimientos sociales en el caso de Cerro de San Pedro, México. *Historiela*, 1(2), 87-135.
- Vassallo, L. F. (2008). *Yacimientos minerales metálicos*. Centro de Geociencia, UNAM. Querétaro, México. Pp. 138.
- Villarreal, F. J. (2004). *Procesos de alteración hidrotermal de skarn en el pilote Coahuila*. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
- Volke, S. T.; Velasco, T. J. A. & De la Rosa, P. D. (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México, D. F., p.143.
- Wallace, H. A. (2007). *Principles and methods of toxicology*. Massachusetts, U.S.A.: CRC Press.

CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

INTRODUCCIÓN

El suelo es un material no consolidado sobre la litosfera, que sirve como medio natural de sustento de vida, en él se encuentran componentes minerales y orgánicos, además de contar con características físicas, químicas y biológicas (Kabata-Pendias, 2010). Sin embargo, es una matriz impactada por diferentes actividades humanas, entre ellas, la práctica de la minería, la cual proporciona altas concentraciones de EPT (metales y metaloides) sobre la superficie del suelo a partir de la lixiviación y la dispersión de los residuos a través del viento y escorrentías, esta actividad puede generar pérdida en la estructura del suelo (destrucción del edafón) que a su vez produce efectos sobre la biota en sus diferentes niveles de organización dado el cambio en las condiciones del suelo. La forma en que los EPT interactúan con el suelo, es a partir de sus propiedades químicas, los metales presentes en residuos sólidos de mina reaccionan con ácidos para formar óxidos básicos, cationes y haluros covalentes (Volke *et al.*, 2005). La forma química de cada elemento tiene influencia directa con su solubilidad, movilidad y toxicidad en el suelo; esta última a su vez depende de la fuente de contaminación y la química del suelo del sitio impactado (Volke *et al.*, 2005). Por ejemplo, el Cd se adhiere fácilmente a partículas de suelo, siendo un elemento que se puede movilizar a través de este, dependiendo de factores como el pH y la cantidad de materia orgánica, generalmente el Cd se adhiere fuertemente a esta última, y puede ser incorporado por plantas a la cadena alimentaria (EPA, 1999; Kabata, 2010). En general la presencia de estos residuos sólidos de mina en el suelo, puede provocar cambios en las propiedades físicas del suelo, como pérdida de estructura, características del agua en el suelo, disponibilidad y movilidad del agua en el suelo, textura, color, porosidad y densidad; igualmente puede modificar las propiedades químicas del suelo como la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC), pH, porcentaje de saturación de bases, nutrimentos para las plantas, carbono orgánico, nitrógeno, salinización, alcalinización, contenido de carbonato de calcio (CaCO_3) y carbonato de sodio (Na_2CO_3); y alterar las propiedades biológicas como el ciclo del N y C (FAO, 2015); y con esto afectar significativamente el desarrollo de la vida en

el suelo. Los residuos sólidos de mina contienen altas concentraciones de metales y metaloides que se caracterizan por ser EPT, estos elementos se cuantifican para comparar entre las concentraciones de los residuos y las concentraciones de seguridad para determinada matriz ambiental u organismo, y de esta forma conocer el potencial tóxico para los componentes del ecosistema.

2.1 SITIOS DE ESTUDIO

Los sitios de muestreo se seleccionaron por sus antecedentes en la actividad minera, asociado a esto, en algunos sitios se tienen estudios previos, referentes a los efectos producidos por los medios ambientales contaminados sobre flora y fauna silvestre así como en humanos; estos sitios se ubican dentro de los límites territoriales de cuatro de los municipios del estado de San Luis Potosí, México (Figura 6).

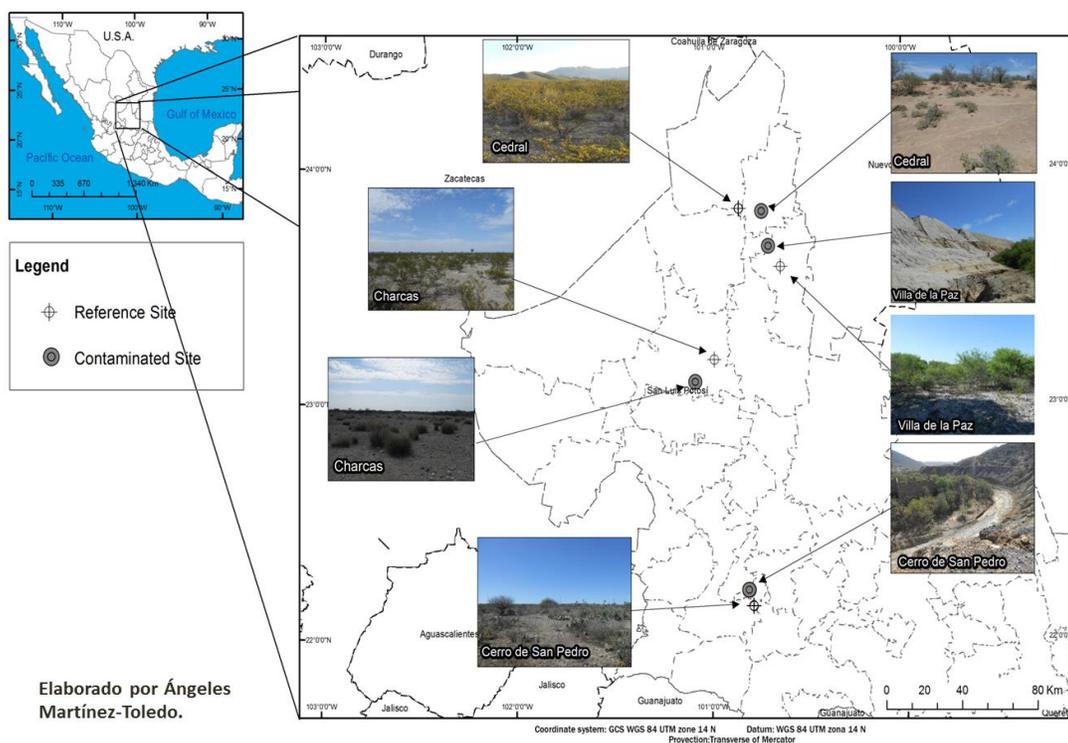


Figura 6. Ubicación geográfica de los sitios de estudio, recuperado de Montes-Rocha (2016).

Las muestras ambientales que se recolectaron en los sitios seleccionados corresponden a residuos sólidos de mina, tomados directamente de presas de jales

o de terreros; y a suelos de referencia, qué nos permitieron comparar los niveles basales de metales, así como conocer las características naturales generales presentes en los suelos de cada sitio.

2.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SUELO Y RESIDUO

Los sitios se seleccionaron según su naturaleza de impacto, que corresponde a la actividad minera histórica y reciente, posteriormente, se determinaron los puntos de colecta de las muestras representativas para cada sitio, se realizó un muestreo dirigido, conducido por el criterio o juicio de los especialistas involucrados, el cual se basó en tomar muestras sobre los residuos procurando cubrir toda el área o solo cubrir áreas accesibles para el muestreo. Se decidió coleccionar diez muestras de suelo de referencia y diez de residuo sólido de mina de cada sitio para obtener datos analíticos que podrán ser reproducibles. A través de esta estrategia, se puede determinar: la concentración de metales en el sitio impactado y de fondo, además del riesgo potencial a la flora y fauna debido a la presencia de metales y metaloides en el ambiente, entre otros (Mason, 1992; Nies, 1999).

Las diez muestras de residuos de cada sitio problema se recolectaron sobre las presas de jales, patios de beneficio o terreros de minería, según correspondió para cada uno (ver Anexos). Las diez muestras de suelo consideradas de referencia se establecieron a una distancia promedio de 8 km lineales de cada sitio problema, además, se tomó en cuenta la dirección de los vientos y corrientes intermitentes de agua que potencialmente pudieran dispersar los residuos hacia los sitios de referencia con concentraciones umbrales. Con base en lo anterior se definieron los niveles de fondo locales de cada sitio naturalmente mineralizado con metales y metaloides en suelos aparentemente no modificados por el ser humano (SCFI, 2006).

Como se mencionó anteriormente, los puntos de muestreo se seleccionaron a partir del muestreo dirigido, llamado también a juicio (Figura 7, a). Se seleccionaron los puntos de muestreo, primero se retiró la vegetación en los puntos de muestreo

que tenían, posteriormente se trazó un cuadrante formado por cuatro sub-puntos de muestreo, se escavó en la superficie del suelo para tomar los primeros 10 cm superficiales de cada excavación y de esta forma obtener una muestra compuesta formada por cuatro sub-muestras (Figura 7, b, c), finalmente se tamizó *in situ* cada muestra compuesta haciéndola pasar por un tamiz de malla de 707 μm (Figura 7, d). El volumen de cada muestra fue de aproximadamente 3 kg el cual corresponde a la cantidad a utilizarse en los bioensayos así como por los análisis fisicoquímicos realizados, considerando un volumen excedente.

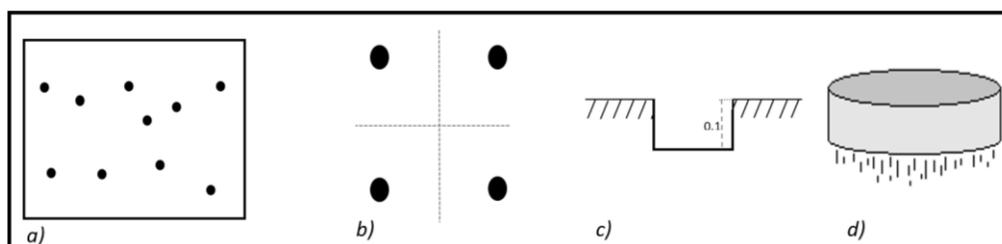


Figura 7. Fases para la toma de muestra ambiental; (a) unidad de muestreo: muestreo dirigido o juicios de experto, (b) muestra compuesta: formada por cuatro sub-muestras, (c) profundidad de cada sub-muestra, (d) tamizado de la muestra *in situ*:

2.3 MEDICIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS EN MUESTRAS AMBIENTALES

Los parámetros fisicoquímicos medidos corresponden al pH y a la CE, estos se midieron a partir del potenciómetro *HANNA instruments* (modelo H1 2316). Para determinar el pH se pesó 1 g de suelo y se colocó en un vaso de precipitado de 50 mL, se le agregaron 10 mL de agua desionizada, se colocó en agitación durante 10 min y se dejó reposar otros 10 min. Después se procedió a calibrar el potenciómetro con soluciones amortiguadoras de pH 7 y 4. Una vez calibrado el potenciómetro se dejó en reposo durante 10 minutos. Posteriormente se tomó la lectura del pH con el potenciómetro. Se pesaron 3 g de suelo, los cuales se colocaron en tubos cónicos de 50 mL. Después se le adicionaron 15 mL de agua desionizada. Se colocaron en agitación durante tres ciclos de 5 min a 800 rpm y luego se dejaron reposar durante 15 min. Inmediatamente al transcurrir el tiempo de reposo se agitaron y se colocaron en una centrífuga a una velocidad de 1000 rpm durante 10 min, una vez terminado

el ciclo, se sacaron los tubos y se colocaron en gradillas para recuperar el sobrenadante. El sobrenadante se colocó en tubos de ensaye para medir la conductividad eléctrica con el electrodo previamente calibrado (Montes-Rocha, 2016).

2.4 CUANTIFICACIÓN DE METALES Y ARSÉNICO

A las muestras de cada sitio de muestreo se le realizó la cuantificación de la presencia de 25 elementos, a partir de un analizador ambiental *Thermo Scientific Niton XL3t*, Gold Series 500 de fluorescencia por Rayos X (XRF), que permite medir las concentraciones de varios elementos presentes en la superficie del suelo. El aparato calcula las cargas como tres desviaciones estándar (intervalo de confianza del 99.7%) para cada elemento. Para realizar el análisis se tomó una muestra compuesta de 4 sub-muestras para obtener un valor con el menor sesgo posible. Después se tamizaron con un tamiz de 2 mm, las muestras de suelo en el sitio con el fin de remover interferencias como: hojas y tallos. El tamizado se realizó varias veces hasta obtener un total de 500 gr y se almacenaron en bolsas plásticas, inmediatamente se procedió a realizar el análisis con el analizador ambiental. Para el análisis, el aparato se calibro utilizando tres filtros durante 1 minuto cada uno, después se abrieron las bolsas donde se colectaron las muestras y se agitaron durante un minuto, se midió cada una de las muestras por triplicado, entre cada lectura se vuelve a revolver la muestra en la bolsa. Cada veinte lecturas se analizaban los estándares con el fin de calibrarlo nuevamente (Montes-Rocha, 2016). Del total de las lecturas, se seleccionaron los elementos metálicos y metaloide que tienen efecto tóxico, además que se hayan registrado en concentraciones superiores a las permitidas por las normas mexicanas y en alguna guía internacional como de la US EPA. Este cribado de requerimientos nos permitió considerar al As, Cd, Cu, Pb y Zn para esta evaluación toxicológica a partir de la exposición a residuos mineros. Cabe señalar que el equipo utilizado tiene un valor límite de detección diferente para cada elemento, el cual se utilizó para las muestras que no registraron concentraciones, estos límites son: As (mg/kg), Cd (12 mg/kg), Cu (13 mg/kg), Pb (8 mg/kg) y Zn (10 mg/kg).



2.5 VALORES UMBRALES DE LAS CONCENTRACIONES DE METALES Y METALOIDES EN SUELO

En México, la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 regula las Concentraciones de Referencias Totales (CRT), estos valores son considerados según el uso de suelo (Tabla 2), cabe hacer mención que esta norma solo cuenta con valores que pueden afectar a la salud humana, y no tiene la regulación de todos los elementos que requerimos en esta evaluación, por tal motivo fue necesario el uso de una regulación internacional por parte de Environmental Protection Agency (Buchman, 2008). Estados Unidos cuentan con una completa regulación que se divide por receptor ecológico, por esta razón fue posible tomar la concentración de referencia para los animales invertebrados, entre ellos se incluye la lombriz de tierra. En conjunto, estas regulaciones nos permiten conocer las concentraciones permitidas y de seguridad en el suelo, así como para los residuos sólidos de mina que por su disposición se encuentran en contacto con este.

Tabla 2. Valores de referencia por país según el uso del suelo y receptor ecológico, concentración dada en mg/kg.

| ELEMENTO | MÉXICO | | ESTADOS UNIDOS |
|-----------|--|------------|----------------|
| | AGRÍCOLA/ RESIDENCIAL/ COMERCIAL | INDUSTRIAL | INVERTEBRADOS* |
| As | 22 | 260 | 60 |
| Cd | 37 | 450 | 20 |
| Cu | - | - | 50 |
| Pb | 400 | 800 | 500 |
| Zn | - | - | 6.62 |

*Valor de referencia proporcionada por la guía internacional US EPA.

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el software *STATISTICA* en su versión 10 (*STATISTICA*, 2011). Los datos que corresponden a este capítulo tienen distribución no normal según la prueba de *Shapiro-Wilk's W*, por lo tanto se ejecutaron pruebas no paramétricas.

Los resultados se presentan en gráficas de *Box-Whiskers* con información de mediana, percentiles (25-75%) y el mínimo-máximo (\pm) de cada muestra independientes por grupos. Se ejecutó la prueba Mann-Whitney U y *Kruskal-Wallis* para comparar la diferencia estadística entre dos muestras por grupos y más de dos grupos respectivamente, con p -valor de 0.05 que representa el 95% de significancia.



2.7 RESULTADOS

En el Tabla 3 se muestran los valores obtenidos para CE y pH, en donde se puede observar la tendencia que a valores bajos de CE el pH es básico, mientras que de lo contrario el pH es ácido. En los sitios problemas el pH es neutro, a excepción de Cerro de San Pedro que tuvo pH ácido, mientras que en los sitios de referencia es básico. El pH ácido favorece la movilidad de varios metales, por lo tanto en Cerro de San Pedro los metales podrían estar muy disponibles por el aporte del pH en el material, mientras que la baja CE favorece la movilidad del As. Por lo anterior, se espera exista correlación en efecto con respecto a la presencia los metales y el metaloide.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de las muestras.

| CLAVE DE SITIO | TIPO | CE (dS/m) | pH |
|--------------------|------------|----------------------|----------------------|
| CEDRAL | Referencia | 0.06 (0.05-0.08) | 8.61 (8.50-8.70) |
| | Problema | 0.77 (0.67-1.03) | 7.97 (7.90-8.00) |
| CERRO DE SAN PEDRO | Referencia | 0.12* (0.05-0.30) | 8.22 (7.47-8.41) |
| | Problema | 1.49* (1.01-2.64) | 4.21* (1.50-6.40) |
| CHARCAS | Referencia | 0.06 (0.05-0.12) | 8.37 (7.70-8.20) |
| | Problema | 0.86* (0.71-1.03) | 7.58 (7.3-8.1) |
| VILLA DE LA PAZ | Referencia | 0.06 (0.04-0.08) | 8.38 (8.30-8.50) |
| | Problema | 0.74 (0.67-0.91) | 7.77 (7.50-8.10) |

Media aritmética (mín.-máx.), valor de latencia para la lombriz de tierra*.

Las concentraciones halladas de EPT en los sitios de muestreo de referencia y problema se compararon entre sí para determinar el aumento en las concentraciones de As, Cd, Cu, Pb y Zn en sus residuos sólidos de mina

depositados a la intemperie. Encontrando que en varias muestras, la computadora de mano *Thermo Scientific Niton XL3t* marcó fuera del límite de detección (Tabla 4).

Tabla 4. Concentraciones (mg/kg) de EPT en los sitios de muestreo.

| SITIO | EPT | REFERENCIA (n=10) | PROBLEMA (n=10) | VALOR DE REFERENCIA US EPA |
|--------------------------|-----|---------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| CEDRAL | As | 28.25 (3.50-44.42) | N.D. | 60 |
| | Cd | N.D. | N.D. | 20 |
| | Cu | N.D. | 1738.81 (1309.11-2475.65) | 50 |
| | Pb* | 30.34 (10.52-40.63) | 7962.72 (5852.14-9325.50) | 500 |
| | Zn* | 119.92 (102.78-138.67) | 4039.91 (3135.15-7164.12) | 6.62 |
| CERRO DE SAN PEDRO | As | N.D. | 1456.01 (866.88-3028.00) | 60 |
| | Cd | N.D. | N.D. | 20 |
| | Cu | N.D. | 162.50 (29.91-286.86) | 50 |
| | Pb* | 67.52 (44.76-82.10) | 6799.30 (3934.67-10973.07) | 500 |
| | Zn* | 93.98 (81.93-113.78) | 3778.05 (587.57-8765.42) | 6.62 |
| CHARCAS | As | N.D. | N.D. | 60 |
| | Cd | N.D. | 480.72 (286.45-585.83) | 20 |
| | Cu | N.D. | 9094.52 (6459.76-12718.39) | 50 |
| | Pb* | 33.45 (21.53-41.87) | 35627.08 (23934.66-43201.78) | 500 |
| | Zn* | 106.39 (82.82-119.82) | 71419.76 (43740.91-82905.06) | 6.62 |
| VILLA DE LA PAZ | As | 9.80 (3.50-27.58) | 8437.95 (3.50-20509.21) | 60 |
| | Cd | N.D. | N.D. | 20 |
| | Cu* | N.D. | 1375.55 (298.27-1892.57) | 50 |
| | Pb* | 27.00 (4.00-47.86) | 1092.57 (527.45-3048.09) | 500 |
| | Zn* | 94.91 (72.82-109.78) | 5604.13 (2390.27-12212.39) | 6.62 |

Mediana (mín.-máx.), N.D.: No detectable. Diferencia estadística ($p < 0.05$) entre sitios de referencia y problema*.

Por lo anterior, solo el Pb y el Zn para todos los sitios obtuvieron concentraciones para ser analizadas estadísticamente entre muestra de referencia y problema, mientras que los otros elementos solo se reporta la concentración media encontrada en el sitio sea de referencia o problema, entendiéndose que la ausencia de valores corresponde a lo explicado con anterioridad. Cabe mencionar que la cuantificación de metales es una variable considerada para analizar el efecto tóxico, y por sí sola no corresponde a una evaluación de toxicidad.



En Cedral la concentración media de As es de 27.03 mg/kg en las muestras de referencia y 1 793.00 mg/kg de Cu en la problema. En la Figura 8 se muestra la comparación de datos para Pb de referencia (\bar{x} = 27.35 mg/kg) y problema (\bar{x} = 7 750.63 mg/kg), y en la Figura 9 para Zn de referencia (\bar{x} = 119.13 mg/kg) y problema (\bar{x} = 4 494.17 mg/kg), encontrando que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre ambos tipos de muestras para ambos elementos.

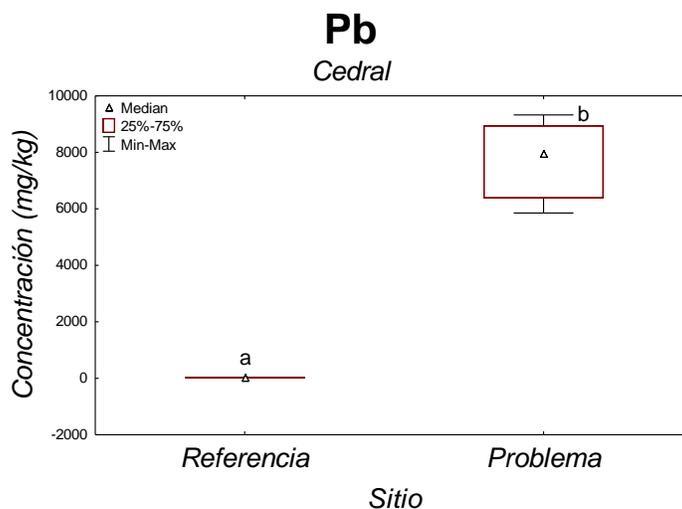


Figura 8. Pb: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Cedral.

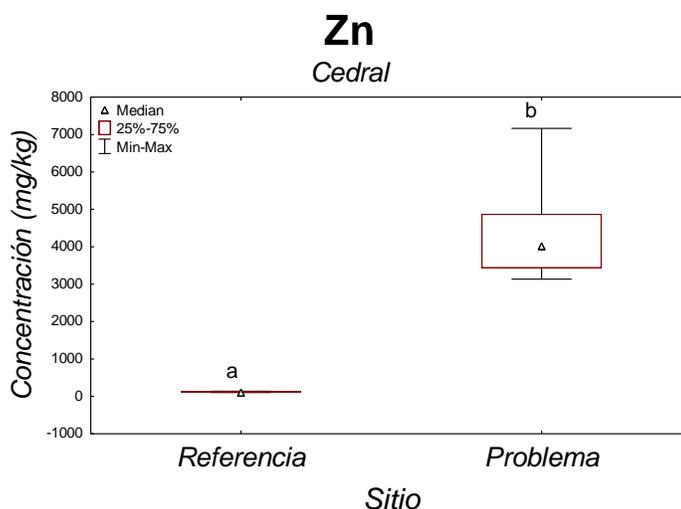


Figura 9. Zn: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Cedral.

En Charcas, no se detectó valores para As, Cd y Cu en el sitio de referencia, mientras que en el sitio problema sí se registró para el Cu y Cd con valores medios de 466.28 y 9 069.23 mg/kg respectivamente. En la Figura 10, se muestra la gráfica para el Pb en el sitio de referencia (\bar{x} = 32.70 mg/kg) y problema (\bar{x} = 34 939.02 mg/kg), en la Figura 11 se presenta la gráfica para Zn con el sitio de referencia (\bar{x} = 106.10 mg/kg) y problema (\bar{x} = 69 542.82 mg/kg), en ambas comparaciones existe diferencia estadística ($p < 0.05$) entre el sitio de referencia y el problema.

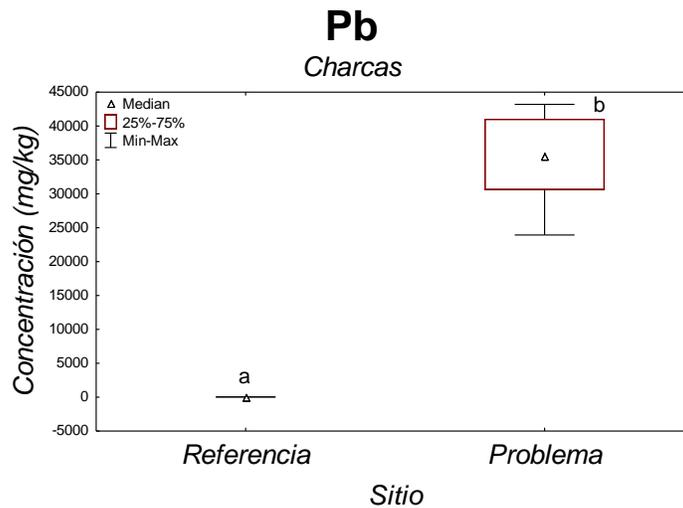


Figura 10. Pb: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Charcas.

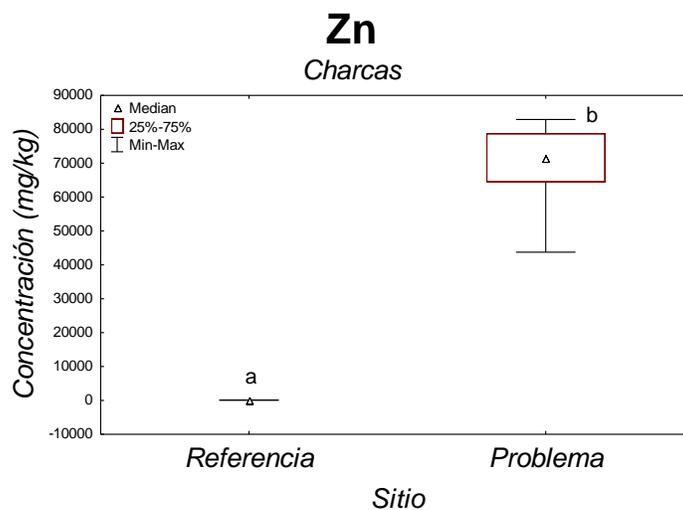


Figura 11. Zn: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Charcas.



Para Cerro de San Pedro solo se obtuvo el valor promedio en las concentración de As con 1 846.16 mg/kg en la muestra del sitio problema, la cual no pudo ser analizada con el programa estadístico debido a la ausencia de datos en el sitio de referencia, como se ha mencionado con anterioridad; y al no haber valores con que comparárseles, mientras que el Cu no se detectó para ambos tipos de muestras. En la Figura 12, se muestra la gráfica con los valores del Pb para el sitio de referencia (\bar{x} = 64.09 mg/kg) y problema (\bar{x} = 7 037.87 mg/kg), y en la Figura 13, para Zn en el sitio de referencia (\bar{x} = 96.25 mg/kg) y problema (\bar{x} = 5 173.09 mg/kg), en ambos casos existe diferencia estadística ($p < 0.05$) entre el sitio de referencia y el problema.

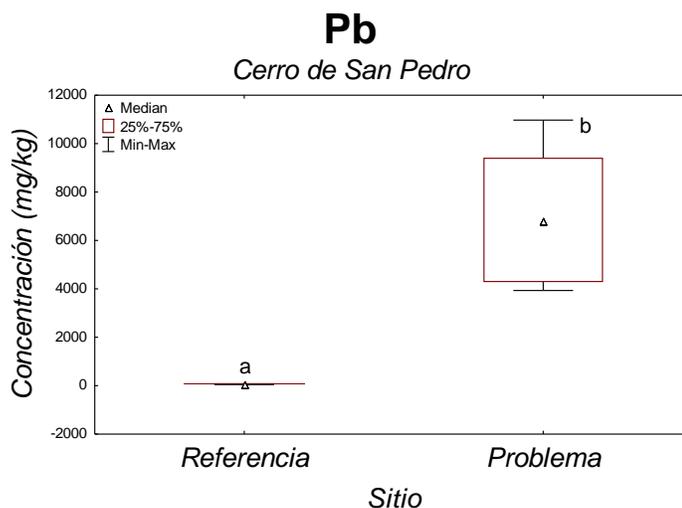


Figura 12. Pb: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Cerro de San Pedro.

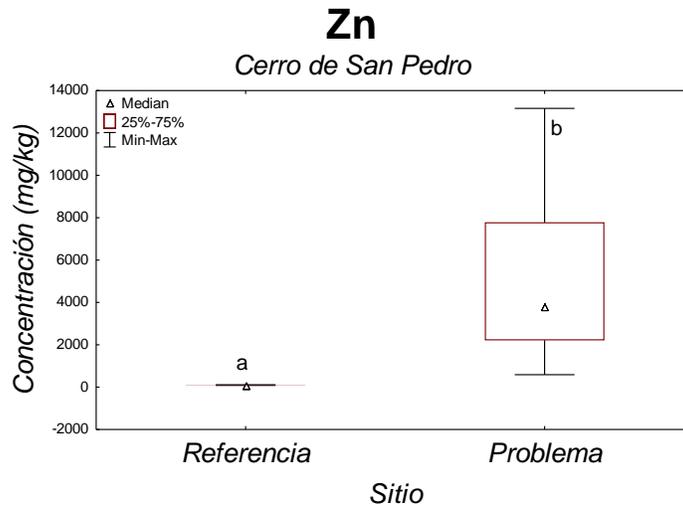


Figura 13. Zn: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Cerro de San Pedro.

Para Villa de la Paz se grafican los valores de As (Figura 14) de los sitios de referencia (\bar{x} = 11.47 mg/kg) y problema (\bar{x} = 8 949.58 mg/kg), para Cu se cuantificaron valores de 1 231.23 mg/kg en el sitio problema. En la Figura 15, se muestra la gráfica para Pb en donde se comparan los valores del sitio de referencia (\bar{x} = 23.31 mg/kg) y problema (\bar{x} = 1 368.41 mg/kg), y en la Figura 16, para Zn con valores de referencia (\bar{x} = 91.60 mg/kg) y problema (\bar{x} = 6 092.89 mg/kg), en As, Pb y Zn se encontró diferencia estadística ($p < 0.05$) entre ambos tipos de muestras ambientales, lo que demuestra una vez más que la actividad minera se encuentra generando residuos con EPT en concentraciones superiores a las halladas de forma natural en el ambiente circundante.

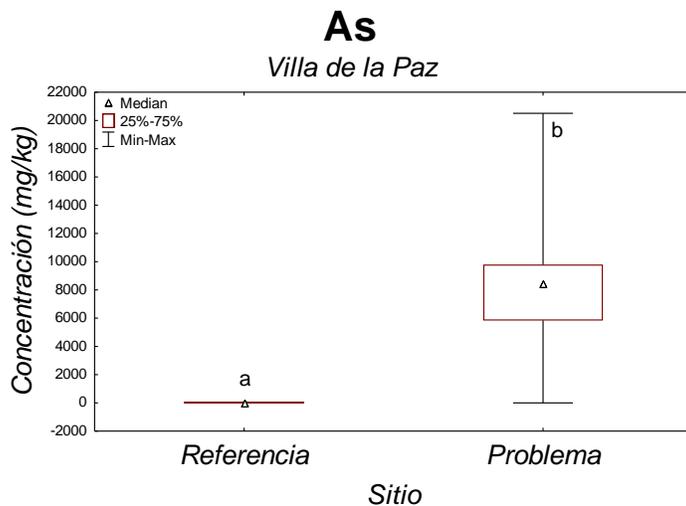


Figura 14. As: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Villa de la Paz.

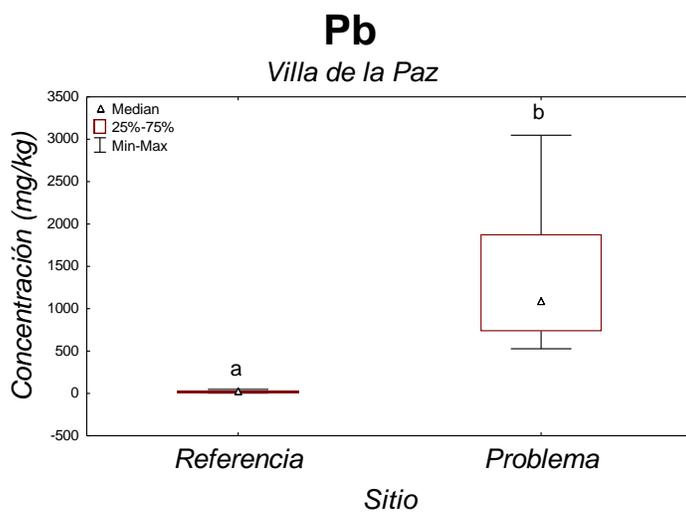


Figura 15. Pb: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Villa de la Paz.

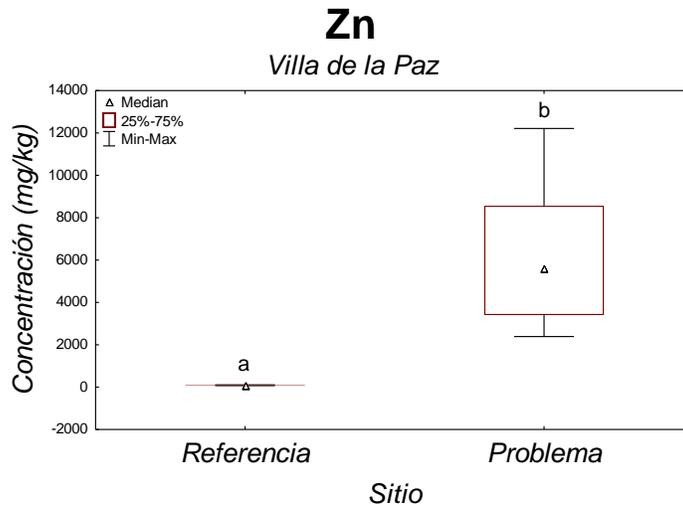


Figura 16. Zn: diferencia estadística entre la muestras de referencia y problema de Villa de la Paz.

Los EPT a los que fue posible realizarles el análisis estadístico (Pb y Zn), mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las muestras del sitio de referencia y problema, lo que indica que los sitios problemas se encuentran en concentraciones por encima de las concentraciones cuantificadas en los sitios de referencia (niveles basales de la zona geológica). Los elementos a los que no fue posible establecer diferencias estadísticas, se debió a que las concentraciones se encuentran debajo el límite de detección. Entonces, con lo que aquí se argumenta, se determinó que la actividad minera ha favorecido el incremento en concentración de Cu para todos los sitios, hasta llegar a superar la guía internacional US EPA; en el caso del Cd en Charcas, la concentración media rebasa los valores de referencia de esta misma guía internacional y la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. El As se encuentra igualmente superando la guía de la US EPA y la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 en los sitios problema de Cerro de San Pedro y Villa de la Paz, mientras que en el sitio de referencia de Cedral se presenta una concentración media superior únicamente en el valor de referencia de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.

Como se menciona anteriormente, los sitios problemas mostraron altas concentraciones de los EPT, por lo tanto, se realizó el análisis estadístico entre todos los sitios con concentraciones superiores al límite de detección para identificar

la diferencia que existe entre ellos y considerarla para la priorización de los sitios. En la Figura 17, se grafican las concentraciones superiores al límite de detección del método de análisis para As en el sitio de Cerro de San Pedro y Villa de la Paz; los otros dos sitios problema no se usaron para este análisis por la falta de datos como se menciona anteriormente. Se obtuvo diferencia estadística ($p > 0.05$) entre ambos sitios, mostrándose Villa de la Paz por encima de Cerro de San Pedro. Por otra parte, en los sitios problema, el Cd solo tuvo valores de detección en las muestras de Charcas (286.45 – 584.83 mg/kg), por lo tanto, no fue posible correr algún análisis estadístico para comparar con otro sitio de muestreo.

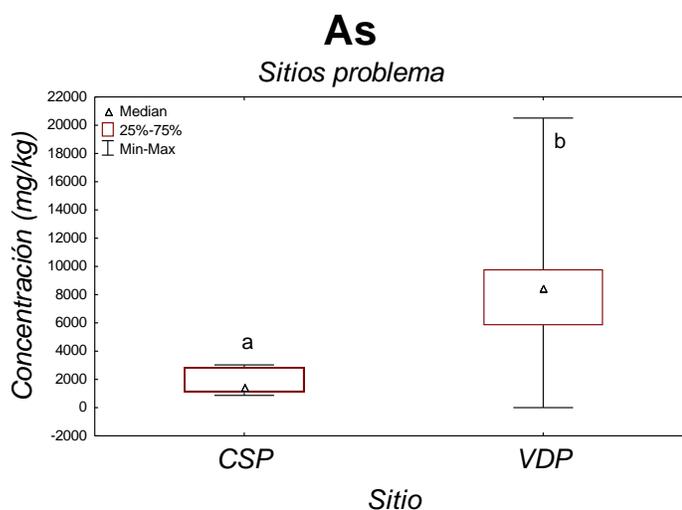


Figura 17. As: diferencia estadística entre las muestras de los sitios problema.

En la Figura 18 se presentan los valores obtenidos de Cu para todos los sitios problemas, determinándose que entre los sitios Cedral y Villa de la Paz no existe diferencia estadística ($p > 0.05$) en sus concentraciones, mientras que Charcas es diferentes a todos, igual que Cerro de San Pedro ($p < 0.05$), cabe señalar que Charcas presenta los niveles más elevados para este metal, superando ampliamente a los otros sitios.

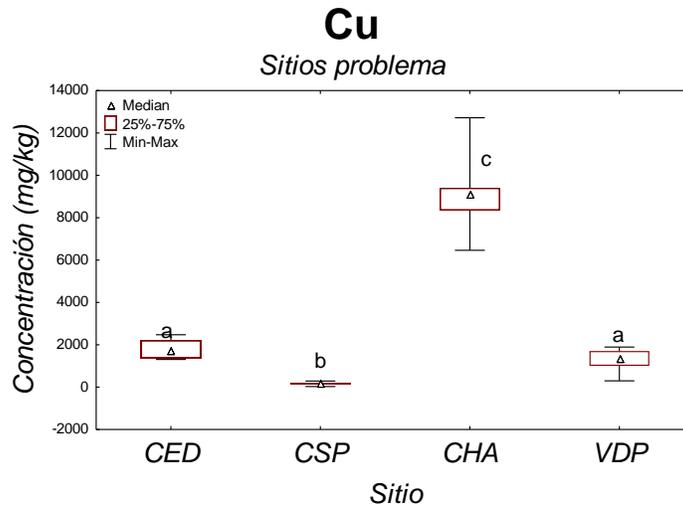


Figura 18. Cu: diferencia estadística entre las muestras de los sitios problema.

En la Figura 19 se muestra que entre los sitios problema de Cedral y Cerro de San Pedro no existe diferencia estadística ($p > 0.05$) en su concentración de Pb, mientras que las muestras de Charcas y Villa de la Paz existe diferencia estadística entre todos los sitios ($p < 0.05$).

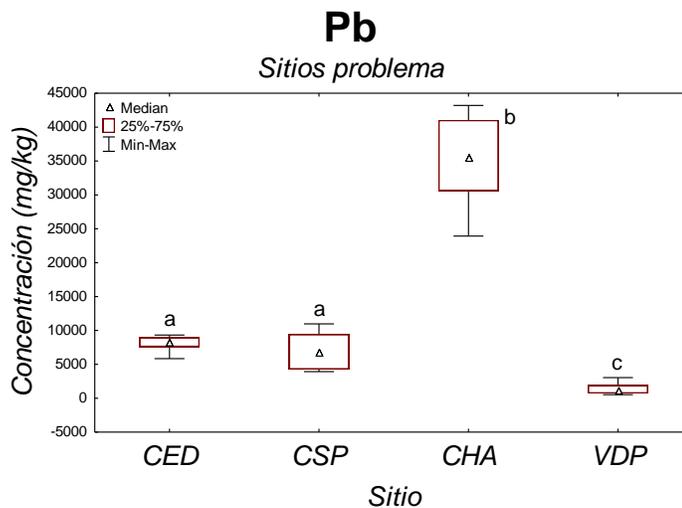


Figura 19. Pb: diferencia estadística entre las muestras de los sitios problema.

En la Figura 20, se observa que entre los sitios Cedral, Cerro de San Pedro y Villa de la Paz, no existe diferencia estadística ($p > 0.05$) entre sus concentraciones



de Zn, mientras que las concentraciones halladas en Charcas muestran valores diferente a los demás sitios y representa la mayor concentración.

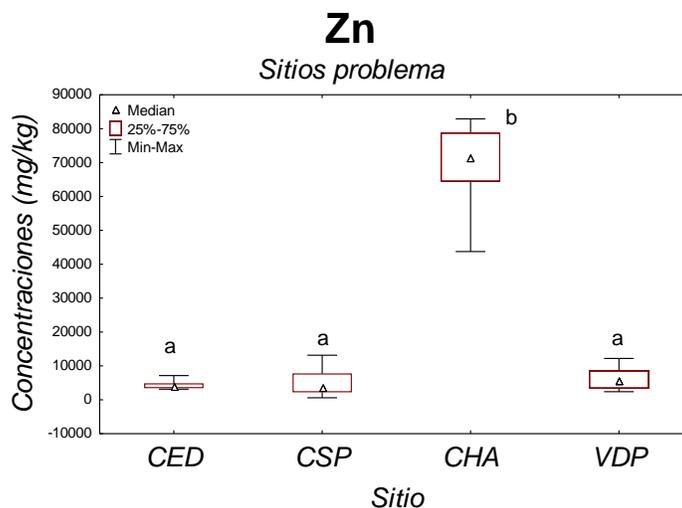


Figura 20. Zn: diferencia estadística entre las muestras de los sitios problema.

Las concentraciones de metales pesados y metaloide que sobrepasan los valores de referencia de la guía US EPA, pueden mostrar efectos tóxicos en los diferentes niveles tróficos del ecosistema. De forma específica en lombrices, estas concentraciones elevadas pueden producir efecto de letalidad, reproductivo, comportamiento, crecimiento, entre otros. Con respecto a los efectos particulares que se atribuyen a estos EPT sobre los seres vivos de un ecosistema se sabe que se bioacumula en tejidos como en lombrices (Dallinger & Rainbow, 1993; Suthar *et al.*, 2008; Kabata-Pendias, 2010), pero no se biomagnifica en los niveles tróficos; en animales puede generar efectos renales, hepáticos y mutagénicos, así como decremento en la estabilidad homeostática de los glóbulos rojos, niveles de hemoglobina y conteo de glóbulos rojos, así como efectos en la respiración celular, al ser la mitocondria el orgánulo más sensible (Fowler, 1983; ATSDR, 2007).

El Cd es soluble en agua por lo que se encuentra más accesible para los componentes del ecosistema, entra a la cadena alimenticia a través de las plantas, en los que puede generar efectos carcinogénicos, en el desarrollo neurológico, incremento de la mortalidad, entre otros (EPA, 1999). Con respecto al Cu, el tracto

intestinal es el blanco más sensible a su toxicidad, y en animales puede dañar órganos como hígado y riñón. Mientras que el Pb en plantas y animales genera efectos en el desarrollo, reproducción, crecimiento, supervivencia, de estrés fisiológico, además, en animales produce efectos neuroconductuales y hematológicos (EPA, 2012; EPA, 2013). El Zn en animales puede tener efectos letales, en alteraciones hematológicas, deterioro en el tracto urinario, decremento en peso y proteínas totales, alteraciones histológicas, en la actividad enzimática en tejidos del sistema reproductivo masculino, en el desarrollo, reproductivo, y puede llegar a ser mutagénico en alguna de sus formas químicas (EPA, 2005).

Por otra parte, se cuantificó concentraciones de As en los sitios problemas de Cerro de San Pedro y Villa de la Paz que sobrepasan los niveles de referencia indicados en la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 y US EPA para invertebrados terrestres, y en el sitio de referencia de Cedral ligeramente sobrepasa el valor límite de la norma mexicana. Se encontró que la concentración de Cd sobrepasa los valores de referencia de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 en el sitio problema de Charcas. Por otra parte, el Cu y el Pb, en los cuatro sitios problemas, se encuentran sobre los niveles de referencia de la guía US EPA y el Pb sobre los valores de la norma mexicana para estos mismos. Por último, el Zn rebasa los niveles de referencia de la US EPA para todos los sitios (referencia y problema), sin embargo, en los sitios problema la concentración de este metal es mayor de un 33.68% hasta un 671.30% con respecto a los sitios de referencia, hallándose diferencia estadística entre las concentraciones.

Cabe señalar que todos los sitios de muestreo son zonas naturalmente mineralizadas y por esta razón se practica la minería, no obstante, la actividad minera puede propiciar la dispersión y así el aumento de concentración de metales y metaloides en la superficie del suelo por diferentes medios antropogénicos y naturales. Sin embargo, las concentraciones basales de algunos elementos pueden estar en altas concentraciones por encontrarse en zonas naturalmente mineralizadas, como en el caso de Cedral, en donde la concentración basal de As sobrepasa el valor de referencia de la norma mexicana. La comparación de



concentraciones que se realiza en este capítulo nos permitió comparar los niveles basales de metales y metaloides con los niveles en residuos, para así, conocer si existe un aumento de concentración entre ambos sitios de muestreo, posiblemente propiciado por la práctica de la minería.

2.8 DISCUSIÓN

Rodríguez (2011) cuantificó algunos EPT en 108 muestras provenientes de los residuos mineros de Cerro de San Pedro, determinando valores promedios de 2 210 mg/kg de As, 14 mg/kg de Cd, 6 608 mg/kg de Pb y 730 mg/kg de Zn. En el presente estudio se determinó 1 846.16 mg/ de As, 151.21 mg/kg de Cu, 7 037.87 mg/kg de Pb y 5173.09 mg/kg de Zn con lo que podemos argumentar que actualmente las concentración de Pb y Zn se encuentran en concentraciones superiores a las reportadas para el 2011. Mientras que Razo *et al.* (2004) y Jasso-Pineda *et al.* (2007) reportaron concentraciones de los mismos cinco EPT en los depósitos mineros de Villa de la Paz, encontrando concentraciones promedio de 1 932 mg/kg de As, 28.4 mg/kg de Cd, 826 mg/kg de Cu, 932 mg/kg de Pb y 1 565 mg/kg de Zn. En el presente trabajo se obtuvo 8 949.58 mg/kg de As, 1 231.23 mg/kg de Cu, 1 368.41 mg/kg de Pb y 6 092.89 mg/kg de Zn, con lo que se puede concluir que estos EPT se encontraron en concentraciones superiores, a excepción del Cd que no se detectó.

Se compararon las concentraciones de As, Cd, Cu, Pb y Zn de los cuatro sitios mineros seleccionados para San Luis Potosí con otros sitios mineros, encontrándose lo siguiente.

Santos-Jallath y colaboradores (2012) cuantificaron las concentraciones de As y algunos metales pesados en residuos sólidos de mina en el municipio de Cadereyta de Montes, Querétaro. Los residuos consisten en tres muestras compuestas provenientes de una mina de extracción subterránea y sus minerales son procesados por el método de flotación, por lo que en los tres residuos se registró 14 663, 1 183 y 3 133 mg/kg de As; 308, 45 y 82 mg/kg de Cd; 459, 267 y 149 mg/kg de Cu; 1 754, 327 y 337 mg/kg de Pb; 0, 507 y 448 mg/kg de Zn. En comparación con los cuatro sitios mineros en San Luis Potosí, resultó que la mayoría de sus concentraciones de As y Cd se encuentran por debajo a lo que reporta Santos-Jallath *et al.*, contrario a las concentraciones de Cu y Pb que se encuentran en su mayoría por encima, mientras que el Zn se encuentra en concentraciones



superiores en todos los sitios problema de San Luis Potosí en comparación con los resultados de este autor.

Meza-Figueroa *et al.* (2009) colectaron 70 muestras en una pila de residuos minero histórico en Nacozari, Sonora, reportando las concentraciones de 29.3 ± 4 mg/kg de As, <40 mg/kg de Cd, 400.5 ± 15.8 mg/kg de Cu, 39 ± 4.2 mg/kg de Pb y 78.8 ± 6.5 mg/kg de Zn. En comparación con los cuatro sitios mineros en San Luis Potosí, se determina que el As está en concentraciones mayores en Cerro de San Pedro y Villa de la Paz, el Cu en Cedral, Charcas y Villa de la Paz, mientras que el Pb y Zn están en mayores concentraciones en todos los residuos de mina de San Luis Potosí.

Favas y colaboradores (2011) colectaron 15 muestras de residuos sólidos de mina en Portugal, encontrando concentraciones medias de 313 mg/kg de As, 1.84 mg/kg de Cd, 147 mg/kg de Cu, 72.7 mg/kg de Pb, 378 mg/kg de Zn. En comparación general con los cuatro sitios mineros de estudio en San Luis Potosí, se determina que solo el As en Cedral y Charcas se encuentra por debajo a lo reportado por Favas *et al.*, mientras que el Cd, Cu, Pb y Zn se encuentran en mayores concentraciones en los residuos de minería en San Luis Potosí.

Al comparar los sitios con actividad de minería antigua y reciente de San Luis Potosí, con los sitios mineros de los estados mexicanos de Querétaro y Sonora, así como del sitio minero internacional en Portugal; en San Luis Potosí se halló mayor concentración de la mayoría de los EPT que anteriormente se mencionan, resultando que la mayoría de los sitios problemas de San Luis Potosí tienen más altas concentraciones de Cu y Pb, y el Zn, mientras que el As y el Cd están en mayor concentración en gran parte de los sitios comparados. Por lo tanto, los residuos sólidos de mina de los sitios seleccionados en San Luis Potosí, pueden tener mayor potencial tóxico según sus altas concentraciones de estos EPT con respecto a los sitios con que se les compara.

Estas altas concentraciones pueden tener efectos letales y no letales, como efectos en el desarrollo, reproducción, crecimiento, neuroconductual, hematológico

y estrés fisiológico; igualmente pueden bioacumularse y pasar a otros organismos que no tienen contacto directo con el suelo o residuo minero, a través de la cadena trófica, produciendo estos mismos efectos toxicológicos en el nuevo receptor ecológico. Además, pudieran disminuir la actividad enzimática en suelos expuestos, y con ello se disminuye la fijación y disponibilidad de algunos elementos como el N, afectando así, los ciclos biogeoquímicos como el del nitrógeno. Con esta serie de efectos se puede llegar a afectar a niveles de organización biológica superiores como población, comunidad y ecosistema.



2.9 CONCLUSIÓN

Con base a los resultados registrados de concentración, se puede concluir que la mayoría de los EPT se encuentran en concentraciones mayores en el sitio problema en comparación con su respectivo sitio de referencia, en la mayoría existe diferencia estadísticamente significativa. Además, igualmente la mayoría de estos EPT en cada sitio problema, se encuentran en concentración alta, según los valores de referencia de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 y la guía internacional de la US EPA para invertebrados terrestres. Los resultados revelan que existe riesgo potencial para la salud humana (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004), debido a que hay concentraciones superiores a las permitidas en el ambiente. En cuanto a los invertebrados, igualmente se encontraron concentraciones que pudiesen estar afectando la salud de los componentes del edafón. Cabe señalar que para el caso del Zn, en los cuatro sitios de referencia se encontraron concentraciones por encima de los valores de seguridad para invertebrados, sin embargo no se puede considerar como concentraciones que representan riesgo para los receptores ambientales porque son suelos naturalmente mineralizados. Con respecto a las concentraciones registradas en otros trabajos, en el sitio problema de Cerro de San Pedro, las concentraciones de Pb y Zn se encuentran en concentraciones más altas, lo mismo que se muestra para el Cu, Pb y Zn para el sitio problema de Villa de la Paz (Rodríguez, 2011; Razo *et al.*, 2004; Jasso-Pineda *et al.*, 2007). Por otra parte, de todos los sitios problemas que se analizaron entre sí, se determinó que Charcas contiene las concentraciones más altas de la mayoría de los EPT en sus residuos sólidos de mina, además de la diferencia estadística que mostró en sus concentraciones con respecto a los demás sitios.

2.10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2007). *Toxicological profile for arsenic*. Atlanta, Georgia.
- Buchman, M. F. (2008). *NOAA screening quick reference tables*. NOAA OR&R Report 08-1, Seattle WA, Office of Response and Restoration Division, National Oceanic and Atmospheric Administration. United States Environmental protection Agency (US EPA), p.34.
- Dallinger, R., & Rainbow, P. (1993). *Ecology of metals in invertebrates*. SETAC Special Publications Series, p.459.
- Environmental Protection Agency (EPA). (1999). *Toxicological review: cadmium and compounds*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2005). *Toxicological review: zinc and compounds*. U.S., Washington, DC.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2005). Human health risk assessment protocol for hazardous waste combustion facilities. Chapter 7: *characterizing risk and hazard*. Office of Solid Waste. United States, p.15.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2012). *Integrated science assessment for lead*. U.S., Washington, DC, EPA/600/R-10/075C.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2013). *Final Report: Integrated Science Assessment for Lead*. U.S., Washington, DC, EPA/600/R-10/075F.
- Favas, P. J. C., Pratas, J., Gomes, M. E. P., & Cala, V. (2011). Selective chemical extraction of heavy metals in tailings and soils contaminated by mining activity: Environmental implications. *Journal of Geochemical Exploration*, 111, 160–171.



Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2015).

Propiedades del Suelo. Recuperado de <http://www.fao.org/home/es/>

Fowler, B. A. (1983). Biological and environmental effects of arsenic Topics in environmental health, *Elsevier Science*, 6, p.283.

Jasso-Pineda, Y., Espinosa-Reyes, G., Gonzáles-Mille, D., Razo-Soto, I., Carrizales, L., Torres-Dosal, a., Mejía-Saavedra, J., Monroy, M., Irina, I. A., Yarto, M., & Díaz-Barriga, F. (2007). An integrated health risk assessment approach to the study of mining sites contaminated with arsenic and lead. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3(3), 344–350.

Kabata-Pendias. (2010). *Trace elements in soil and plants*. Boca Raton, FL.: CRC Press.

Leung, A. O. W., Duzgoren-Aydin, N. S., Cheung, K. C., & Wong, M. H. (2008). Heavy metals concentrations of Surface dust from e-Waste recycling and its human health impactations in Southeast China, *Environmental Science and Technology*, 42, 2674-2680.

Mason, B. (1992). *Preparation of soil sampling protocols: sampling techniques and strategies*. En Tania Volke Sepúlvera, et al. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología.

Meza-Figueroa, D., Maier, R. M., O-Villanueva, M. d. I., Gómez-Alvarez, A., Moreno-Zazueta, A., Rivera, J., Palafox-Reyes, J. (2009). The impact of unconfined mine tailings in residential areas from a mining town in a semi-arid environment: Nacozari, Sonora, Mexico. *Chemosphere*, 77, 140–147.

Montes-Rocha, J. Á. (2016). *Efecto de los metales pesados en suelo de jales mineros de San Luis Potosí*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, SLP.

- Nies, D.H. (1999). *Microbial heavy-metal resistance*. En Tania Volke Sepúlvera, et al. 2005. Suelos contaminados por metals y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología.
- Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, *Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio*.
- Razo, I.; Carrizales, L.; Castro-Larragoita, J.; Díaz-Barriga, F.; & Monroy, M. (2004). *Arsenic and heavy metal pollution of soil, wáter and sediments en a semi-arid climate mining are in Mexico water, air, and soil pollution*. 152: 129-152.
- Rodríguez R.J. (2011). *Evaluación de la contaminación por metales en pasivo ambiental de actividad metalúrgica histórica en el distrito minero Cerro de san pedro, S.L.P. (México)*. Tesis de Maestría. UASLP, San Luis Potosí, México.
- Santos-Jallath, J., Castro-Rodríguez, A., Huezco-Casillas, J., & Torres-Bustillos, L. (2012). Arsenic and heavy metals in native plants at tailings impoundments in Queretaro, Mexico. *Physics and Chemistry of the Earth*, 37–39.
- Secretaría de Comercio y Fomento a la Industria NMX-AA-132-SCFI-2006, *muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales y metaloides, y manejo de la muestra*, p.29.
- StatSoft, Inc. (2010). *STATISTICA (data analysis software system)*. Version 8.0. www.statsoft.com.
- Suthar, S., Singh, S., & Dhawan, S. (2008). Earthworms as bioindicator of metals (Zn, Fe, Mn, Cu, Pb and Cd) in soil: Is metal bioaccumulation affected by their ecological category?. *Ecological engineering*, 32, 99-107.



Volke, S. T.; Velasco, T. J. A. & De la Rosa, P. D. (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México, D. F., p.143.

**CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA:
BIOENSAYOS DE MORTALIDAD Y MIGRACIÓN**



INTRODUCCIÓN

Para que un ion de algún elemento tenga efecto fisiológico o tóxico sobre un organismo, primero debe entrar a la célula. Los cationes metálicos divalentes (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+}) son estructuralmente muy similares entre sí, por esta semejanza estructural, ciertos cationes metálicos divalentes pueden desplazar a otros con funciones fisiológicas importantes para la célula. Por ejemplo, si el Zn^{2+} es remplazado por el Ni^{2+} , o el Be^{2+} por Mg^{2+} , desactivándose y perdiendo su función. La sustitución de Ca^{2+} por otros metales en proteínas de la membrana provoca desordenes funcionales (Nies, 1999). Los cationes de varios metales (Ca, Fe, Cu, Na, K, Mg, Zn, Mn y Cr) juegan un papel importante como elementos traza en reacciones bioquímicas. Muchos metales son dañinos para el metabolismo al no ser esenciales o por encontrarse en altas concentraciones, ya que pueden reaccionar e inhibir una serie de sistemas enzimáticos; algunos iones de estos elementos (Hg^{2+} , Cd^{2+} y Ag^{2+}) forman complejos tóxicos inespecíficos en la célula, lo que produce efectos tóxicos en cualquier función biológica. Elementos como el As, Antimonio (Sn), Hg, Pb y talio (Tl), pueden formar iones órgano-metálicos liposolubles capaces de penetrar membranas y acumularse en las células. Aun elementos sin propiedades tóxicas en baja concentración, como el Zn^{2+} o Níquel (Ni^{2+}) y Cu^{2+} , son tóxicos en concentraciones altas. En relación con lo anterior, cationes tri- o tetra-valentes de otros metales (Sn, Ce, Ga, Zr y Th) no son tóxicos debido a su baja solubilidad. Del resto de los metales, el Fe, molibdeno (Mo) y Mn son elementos esenciales pero pueden llegar a ser tóxicos en concentraciones elevadas, el cobalto (Co), cromo (Cr), Cu, Ni, vanadio (V), wolframio (W) y Zn son tóxicos con importancia biológica moderada; y elementos como plata (Ag), As, Cd, Hg, Pb, Sb y uranio (U), no tienen importancia biológica significativa como elementos traza y se consideran tóxicos (Volke *et al.*, 2005). Por lo anterior, se realizan bioensayos toxicológicos para conocer el efecto que genera la amplia composición química de los residuos sólidos de mina.

Los bioensayos toxicológicos permiten evaluar la respuesta biológica de un organismo expuesto a cualquier estresor ambiental, permitiendo medir cualitativa o

cuantitativamente el potencial tóxico de estresores ambiental, como lo son los residuos sólidos de mina. La lombriz de tierra *E. andrei* es ampliamente utilizada como organismo de prueba, principalmente por ser de fácil manejo en condiciones de laboratorio, por su corto ciclo de vida y, por encontrarse en contacto directo (dérmico e ingesta) y tener sensibilidad a estresores ambientales en suelo. Entre las principales pruebas de toxicidad en lombriz esta la prueba de mortalidad, a partir de una exposición sub-crónica de 14 días en las muestras de suelo y residuo, para lo cual, se contabiliza el número de individuos inicial y final; complementando estos datos, igualmente se registra el peso de los anélidos. Otra prueba de toxicidad es la que describe Palafox y colaboradores (2012) prueba de migración o evasión que se basa en el comportamiento, esta prueba consiste en utilizar cámaras de migración circulares formada por 6 cámaras o espacios que se unen en un espacio céntrico, utilizado para colocar las lombrices de prueba, su duración es de 48 h y durante este tiempo las lombrices se mueven entre los diferentes contenidos de las cámaras, para finalmente aportar datos cualitativos según la posible evasión con respecto al estresor.



3.1 SELECCIÓN DE ESPECIE DE PRUEBA

El diseño experimental realizado para evaluar el potencial tóxico que generan los estresores ambientales en los suelos y residuos, incluye el uso de organismos terrestres de prueba, por tal razón, se decidió utilizar la lombriz de tierra *E. andrei* (Figura 21), este anélido fue elegido por su importancia ecológica; que radica en desarrollarse de forma natural en la superficie del suelo y su interacción con este, igualmente, por su corto ciclo de vida adaptable a pruebas experimentales, por su sensibilidad a los estresores ambientales de interés y por ser organismos de prueba con referencias en su uso en experimentos toxicológicos (OECD, 1984; Cristense & Mather, 1994; Byung-Tae *et al.*, 2008; Conder & Lanno, 2003; Scroggins, 2004; Espinoza-Navarro *et al.*, 2013).



Figura 21. Lombriz: *Eisenia andrei*.

La importancia ecológica que caracteriza a esta especie es significativa para sustentar su uso, debido a que al habitar en los primeros centímetros superficiales del suelo y, por ende, consumirlo, asegura su exposición oral y dérmica a los componentes de este; asimismo, esta especie tienen la capacidad de transformar la materia orgánica en humus para así contribuir en el enriquecimiento del suelo; junto con otros organismos que habitan en el edafón; sin embargo, esta importante función puede ser afectada por la presencia estresores ambientales, estos son elementos o compuestos exógenos al suelo o concentraciones poco tolerables (Gaete, *et al.*, 2009).

Para evaluar los efectos que generan los estresores ambientales provenientes de residuos, se realizaron pruebas de toxicidad en donde se estandariza las condiciones ambientales y físicas para la supervivencia de estos anélidos terrestres, en donde la única variante fue la presencia del estresor ambiental, es decir, compuestos y elementos presentes en los residuos sólidos de mina. Posterior a las pruebas de toxicidad o exposición, se determinó la supervivencia y migración (Cristense & Mather, 1994; Scroggins, 2004; Espinoza-Navarro, Ferreira & Bustos-Obregón, 2013). La especie *E. andrei* actualmente se encuentra bien documentada debido a que se cuenta con extensos estudios, principalmente para determinar los efectos producidos por los metales pesados y arsénico; y su distribución es cosmopolita, frecuentemente se usan en pruebas de letalidad aguda (Conder & Lanno, 2003; Scroggins, 2004; Byung-Tae, *et al.*, 2008) por su corto ciclo de vida que permite realizar pruebas de corta duración (OECD, 1984).

Aclimatación de E. andrei

El grupo de lombrices de la especie *E. andrei* que se utilizaron en las pruebas de toxicidad se adquirieron de la empresa Biocultura SLP que funge como Centro de Capacitación y Servicios Agropecuarios Sustentables, en la capital de San Luis Potosí, México. Estos anélidos adquiridos, fueron trasladados al Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, ubicado en la Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACYT), en donde se conservaron a condición ambiental óptima dentro de una incubadora a temperatura de 25 ± 3 °C, con fotoperiodos de 16:8 horas de luz-oscuridad, utilizando luz incandescente con intensidad de 600 a 700 lux; esta intensidad lumínica es de 125 a 250 veces menos intensa que la luz solar máxima (OECD, 1984; Scroggins, 2004), se conservaron en un sustrato orgánico conformado por *peat moss* de $\text{pH} \geq 6$, este sustrato orgánico se hidrató periódicamente con agua desionizada para mantener el porcentaje de humedad de 40 a 80 %, durante los 14 días como tiempo de aclimatación, asimismo, se adicionó abono comercial curado de borrego para alimentar las lombrices y conservar sus condiciones como organismos de prueba.



3.2 ESTANDARIZACIÓN DE LAS PRUEBAS

Dentro del diseño experimental se plantea los métodos a utilizar y la estructura general para evaluar la exposición de los organismos de prueba sobre diferentes sustratos o tratamientos; no obstante, estos métodos se encuentran publicados de forma generalizada para poder ser aplicados con cualquier variable ambiental (medio ambiental, contaminante, especie, etc.) y para cualquier caso de estudio, por esta razón, se debe adaptar al estudio en específico cada técnica del método, o partir de publicaciones equivalentes, para que la prueba experimental específica sea aceptada y reproducible, para ello, se realizan ensayos preliminares en donde se desarrolla la experimentación con menor número de pruebas, esto nos permite identificar los espacios donde se debe modificar o mejorar las técnicas del método, apoyándose de publicaciones que conciertan en objetivos.

Debido a que las muestras provienen de sitios áridos, los suelos no tienen las propiedades físicas requeridas para recrear las condiciones naturales para la supervivencia de la lombriz, de igual forma se consideró para los residuos; por esta razón, se requiere utilizar un sustrato que proporcione textura a las muestras. Considerando que estas muestras son de textura fina (FAO, 2015) se decidió añadir *peat moss*, puesto que es un sustrato orgánico que proporciona textura, consistencia, porosidad y mejor movimiento del agua en las muestras. Para ello, se consideraron dos proporciones de mezcla, 50-50% y 25-75% de muestra-*peat moss* respectivamente, de las cuales se evaluó la supervivencia en bioensayos de prueba.

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Diseñar anticipadamente las etapas experimentales nos permitió vislumbrar las generalidades del estudio y con ello planear adecuadamente la intervención práctica, a partir de la implementación de bioensayos de mortalidad y migración con la lombriz de tierra *E. andrei*, y su uso posterior para determinar la fragmentación del ADN como biomarcador de efecto en celomocitos; las pruebas se realizaron para cada sitio de interés. El diseño consistió en el estudio de cuatro sitios con actividad minera actual o histórica, donde de cada se colectó 20 muestra, de las

cuales 10 muestras corresponden a residuos mineros y 10 muestras más a suelo de referencia local con bajo o nulo impacto de actividades humanas. Aunado a lo anterior, se decidió complementar las pruebas toxicológicas con la realización de una prueba control negativa, a base del sustrato orgánico *peat moss*; este sustrato es utilizado comúnmente para el cultivo de lombriz y con ello fue posible obtener los efectos basales de los organismos de prueba, esta prueba se realiza para validar el método y con ello obtener mayor fiabilidad en la evaluación.

De cada muestra se prepararon dos réplicas para ser utilizadas como bioensayo de letalidad, y con ello se obtuvo mayor fiabilidad en los resultados generados; cabe señalar que, por la cercanía entre los puntos de muestreo y, la heterogeneidad de los residuos (mezcla de elementos y compuestos de un mismo yacimiento) o geología homogénea de los sitios de referencia local, se considera que el número de colecta de muestras por sí misma es suficientemente representativa, por esta razón, se decidió realizar únicamente duplicados y no triplicados por cada muestra colectada. En cada réplica se evaluó la supervivencia de 10 lombrices de tierra, a las cuales, se le tomó el peso inicial y final con respecto a la tiempo de exposición, esto es, para complementar y reforzar los datos adquiridos de la supervivencia. En el bioensayo de Migración se utilizaron las muestras de suelo y residuo, y el control negativo; cada tipo de muestra se colocó por duplicado en el contenedor de migración.

3.4 METODOLOGÍA

La metodología para realizar los Bioensayos de Mortalidad y de Migración se describe por Alejo *et al.*, (2012) en el capítulo segundo «Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con lombrices» del libro publicado por SEMARNAT-INE referente a Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos.



3.4.1 BIOENSAYO DE MORTALIDAD

Se evaluó la sobrevivencia de la lombriz *E. andrei* expuesta a suelos, residuos y sustratos a partir de lo descrito en la guía internacional de la OECD 207 (1984) con las modificaciones pertinentes. La prueba tiene una duración de 14 días, en los cuales los bioensayos se desarrollaron en una incubadora (Lumistell, modelo ICP-30) para conservar a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ la temperatura. Esta prueba toxicológica se realizó en frascos ámbar de 100 mL (Figura 22), en donde se colocó 50% de muestra ambiental y 50% de *peat moss*; se decidió utilizar este sustrato orgánico para proporcionar mejores propiedades físicas a los suelos y residuos, como porosidad y movimiento del agua (FAO, 2015), permitiendo de esta forma, facilitar la exposición de las lombrices sobre estos; igualmente se conservó la humedad de los bioensayos entre 40 a 50%. En cada frasco ámbar se colocaron 10 lombrices adultas con clitelo registrando el peso inicial en el día 0 y el peso final en el día 14, se realizó el conteo de las lombrices sobrevivientes de cada muestra, a partir de verificar la reacción al estímulo mecánico en el extremo frontal, de esta forma, se determinó el número de sobrevivientes, posteriormente se registró el peso final para conocer el porcentaje de disminución de peso que es complementario al efecto de sobrevivientes de las lombrices por muestra o tratamiento.



Figura 22. Bioensayos de Mortalidad.

El diseño experimental para esta experimentación se conforma de cuatro sitios de muestreo caracterizados por su actividad minera histórica, en cada sitio se

colectaron 10 muestras de suelos de referencia y 10 muestras de residuos sólidos de mina; por cada muestra se realizaron dos réplicas, así mismo, se realizó una prueba control negativo con *peat moss*.

El desarrollo de este bioensayo permitió realizar un seguimiento del peso inicial y final de las lombrices expuestas, para ello se lavaron las lombrices con agua purificada comercial y se dejaron en un vaso de precipitado con papel filtro húmedo durante 5 h en promedio para favorecer el vaciado intestinal, posteriormente las lombrices se lavaron con agua desionizada, se secaron ligeramente, se colocaron en grupo de 10 lombrices para ser pesadas e conjunto, se registró el peso inicial y se colocaron en el frasco correspondiente. Pasado los 14 días de exposición se obtuvieron las lombrices sobrevivientes, estas se lavaron con agua desionizada, se colocaron en un vaso de precipitado con papel filtro húmedo previamente etiquetado según el frasco de proveniencia, se dejaron 5 h aproximadamente para que vaciaran su intestino, posteriormente se volvieron a lavar con agua desionizada, se secaron ligeramente y se pesaron nuevamente pero esta vez solamente con las lombrices que sobrevivieron por grupo. El peso registrado se normalizó (Ecuación 1) para eliminar el efecto de la escala de valores de peso y obtener valores que muestren las mismas proporciones en una escala estándar.

$$\text{Peso normalizado} = \frac{\text{Peso } t_n}{\text{Peso } t_0} \quad \text{Ecuación 1}$$

En la Ecuación 1 se representa la normalización de los valores para el peso de las lombrices de prueba, en donde el peso en el tiempo n es dividido por el peso en el tiempo 0 . El valor resultante sigue la escala de 0 a 1, en donde 1 representa la pérdida nula del peso y 0 indica lo contrario; un valor mayor a 1 representa la ganancia de peso durante la prueba de 14 días.

3.4.2 BIOENSAYO DE MIGRACIÓN

Para realizar los bioensayos de migración se utilizaron contenedores especiales para inducir el movimiento de los organismos de prueba, cada

contenedor consta de seis cámaras migratorias y entre ellas hay accesos para facilitar la movilidad entre cada cámara (Figura 23).

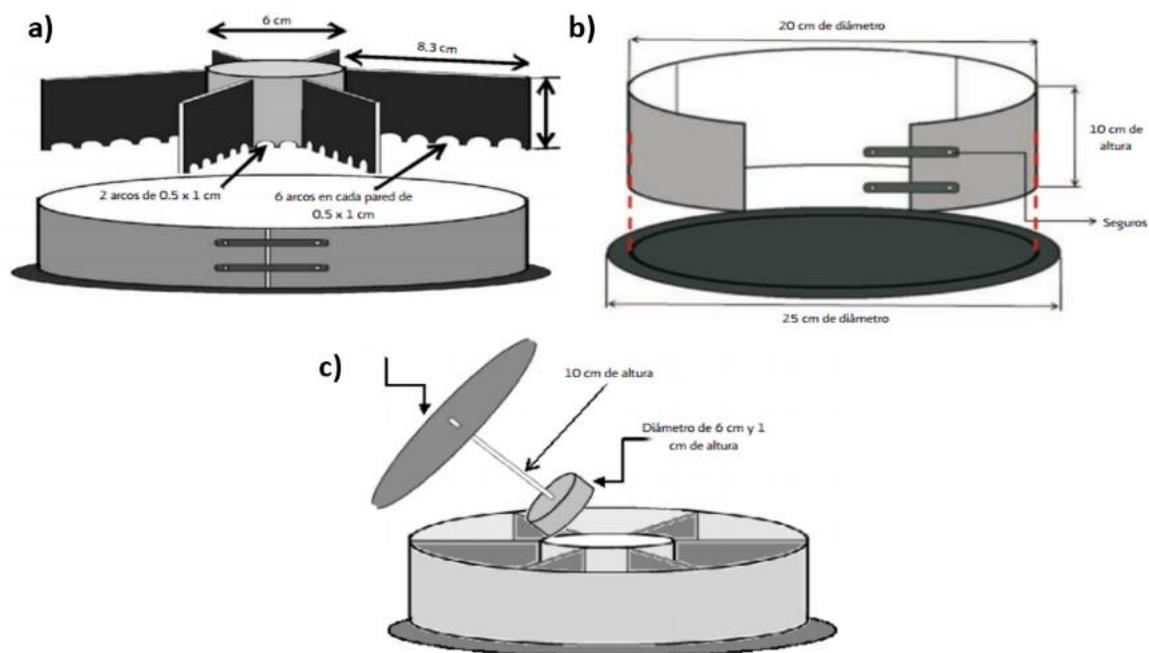


Figura 23. Contenedores de seis cámaras: a, dimensiones internas; b, dimensiones externas; c, contenedor completo. Modificado de Cuevas et al., 2012.

El desarrollo de la prueba consistió en colocar las muestras de suelos de referencia y residuos de mina, al 100%, ocupando dos cámaras cada tipo de muestra, en las dos cámaras restantes se colocó *peat moss* (Figura 24); de esta forma se obtuvo la movilidad preferente de las lombrices provocada por la variedad disponible de material sólido (suelo, residuo y materia orgánica). Como se mencionó en el Capítulo 1, las lombrices son sensibles a estresores ambientales, debido que por conducto de la exposición dérmica, ellas pueden distinguir el material sólido en el cual pueden sobrevivir, y por ende le dan preferencia, mostrando una mayor tasa inmigratoria. Las lombrices utilizadas eran adultas con clitelo, en cada contenedor migratorio se colocaron 10 lombrices en el centro de este (Figura 25), para que por sí mismas seleccionaran la cámara a la que preferían migrar, este bioensayo tiene un tiempo de duración de 48 h, el cual se conservó en una incubadora (Lumistell, modelo ICP-30) con fotoperiodos 16:8 horas de luz-oscuridad para semejar las condiciones naturales.

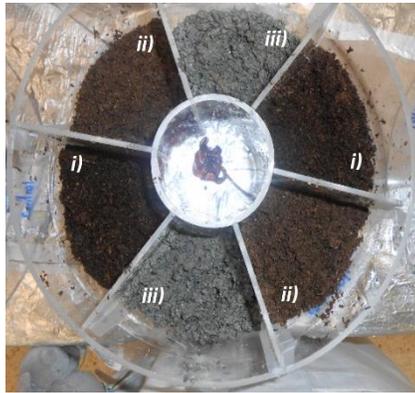


Figura 24. Distribución de las muestras ambientales y el control negativo. i) Control negativo, ii) Suelo de referencia, iii) Residuo sólido de mina. Vista frontal.

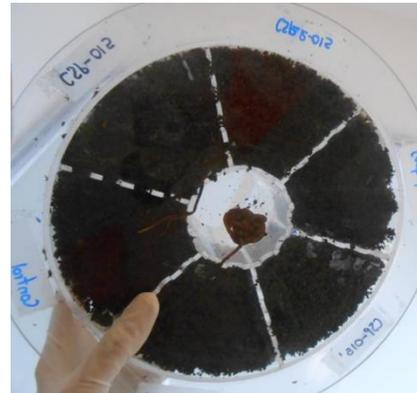


Figura 25. Movilidad de lombrices expuestas. Vista posterior.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el software *STATISTICA* en su versión 10 (STATISTICA, 2011). Únicamente para la pérdida de peso se realizó un análisis estadístico, los datos de peso tuvieron distribución no normal según la prueba de *Shapiro-Wilk's W*, por lo tanto se ejecutaron pruebas no paramétricas, por lo tanto se ejecutó la prueba Mann-Whitney U para determinar la diferencia estadística entre dos variables (muestra de referencia-muestra problema para cada sitio de estudio) con p -valor de 0.05 que representa el 95% de significancia.



3.6 RESULTADOS

Como se mencionó en las pruebas preliminares, se requirió realizar una mezcla de muestra-*peat moss* (m.a.-p.m.), donde los resultados obtenidos con las muestras de referencia fue de 90% de supervivencia (con mezcla 50-50% m.a.-p.m.) y 100% de supervivencia (con 75-25% m.a.-p.m.), y para las muestras conformadas por residuos sólidos de mina la supervivencia fue de 85% (con mezcla 50-50% m.a.-p.m.) y 55% (con 75-25% m.a.-p.m.). Con base a los resultados obtenidos, se seleccionó la proporción de mezcla del 50-50% muestra-*peat moss* para todos los Bioensayos de Mortalidad y por consiguiente para la prueba de genotoxicidad. En el caso de los bioensayos de migración, se decidió utilizar las muestras al 100%, debido a que se pretendió observar el efecto que se generaba con las muestras completas.

En la prueba de mortalidad se obtuvo en su mayoría el 100% de supervivencia, exceptuando los sitios problema de Cerro de San Pedro y Charcas (Tabla 5), la letalidad de este primer sitio puede deberse a que el pH es ácido, permitiendo la movilidad y disponibilidad de los elementos tóxicos.

Tabla 5. Porcentaje de supervivencia por sitio (bioensayo de mortalidad), y control negativo.

| SITIO | TIPO | SUPERVIVENCIA (%) |
|--------------------|------------|-------------------|
| CEDRAL | REFERENCIA | 100 |
| | PROBLEMA | 100 |
| CERRO DE SAN PEDRO | REFERENCIA | 100 |
| | PROBLEMA | 63.5 |
| CHARCAS | REFERENCIA | 100 |
| | PROBLEMA | 96 |
| VILLA DE LA PAZ | REFERENCIA | 100 |
| | PROBLEMA | 100 |
| - | CONTROL | 100 |

Con los pesos de las lombrices registrados en la prueba de mortalidad se generó el peso normalizado (Figura 26), el cual nos permite determinar la pérdida de peso o crecimiento de este organismo de prueba. Con la normalización de los datos se determinó la diferencia estadística entre el peso inicial y final de las

lombrices de cada muestra, resultando que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) para las muestras de referencia y problema de Cedral, y en la muestras problema de Cerro de San Pedro y Charcas, mientras que sí existe diferencia estadística ($p > 0.05$) en las muestras y sitio restante. En la Figura 26, se observa que las muestras problema favorecieron la mayor pérdida de peso en las lombrices en comparación con la muestra de referencia correspondiente, mientras que las lombrices del control negativo ganaron peso durante la prueba de 14 días.

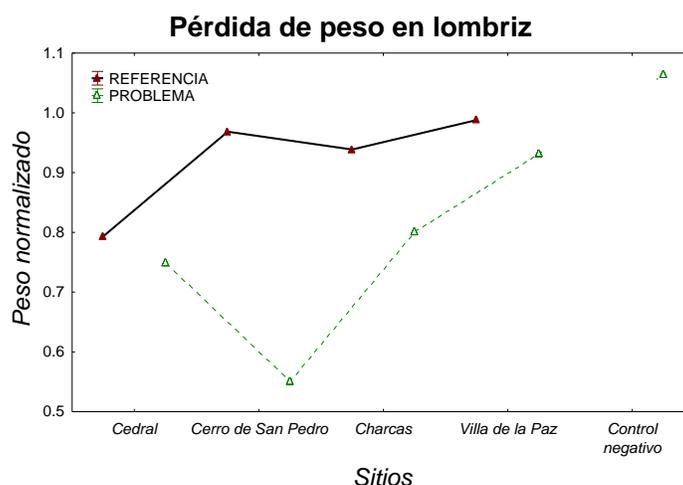


Figura 26. Comparación por muestras y por sitios de la pérdida de peso en lombriz.

En la prueba de Migración (Tabla 6) se obtuvo lo siguiente, en las muestras de Cedral el 100% de las lombrices prefirieron migrar hacia el sustrato control; mientras que en las muestras de Cerro de San Pedro, el 17% de las lombrices prefirió el suelo de referencia y las restantes al control; en las pruebas realizadas para Charcas, solo el 3% de la población prefirió el suelo de referencia, y las restantes el control; por último, en la prueba de Villa de la Paz, el 21% de las lombrices prefirió el suelo de referencia, el 78% el control, y el 1% la muestra problema.

Tabla 6. Porcentaje de inmigración por sitio (prueba de migración).

| SITIO | TIPO | PORCENTAJE DE INMIGRACIÓN |
|--------|------------|---------------------------|
| CEDRAL | REFERENCIA | 0 |



| | | |
|---------------------------|------------|-----|
| | PROBLEMA | 0 |
| | CONTROL | 100 |
| CERRO DE SAN PEDRO | REFERENCIA | 17 |
| | PROBLEMA | 0 |
| | CONTROL | 83 |
| CHARCAS | REFERENCIA | 3 |
| | PROBLEMA | 0 |
| | CONTROL | 97 |
| VILLA DE LA PAZ | REFERENCIA | 21 |
| | PROBLEMA | 1 |
| | CONTROL | 78 |

3.7 DISCUSIÓN

Según los resultados de letalidad en *E. andrei* obtenidos por Kim *et al.* (2016), muestran que por exposición de 7 días a suelos contaminados con Cu a diferentes concentraciones, se obtiene de 7% (100 mg/kg) a 85% (500 mg/kg) de letalidad, mientras que con la mezcla de elementos en los residuos de Cerro de San Pedro y Charcas se generó 36.5% y 4% de letalidad en lombrices expuestas a 169.76 y 9 069.23 mg/kg de Cu respectivamente, se observan resultados que hacen notar que la concentración de este elemento no está directamente relacionado con el efecto de letalidad como en el caso de este artículo, posiblemente se deba a su bioaccesibilidad, entre otros. No obstante, la presencia del Cu en conjunto con otros elementos tóxicos sí está mostrando efectos en el comportamiento migratorio de las lombrices expuestas.

En la tesis realizada por Otomo (2011), se determinó el estrés que se genera en *E. andrei* al ser expuesta a diferentes concentraciones de Cd y Zn sobre suelo artificiales, encontrando que a la cuarta semana se registra un 3.3% de letalidad con 500 mg/kg de cada elemento y 80% de letalidad con 750 mg/kg de cada elemento, mientras que en los sitios problema de Cerro de San Pedro y Charcas se registró un 36% y 4% de letalidad en concentraciones de 5 419.67 mg/kg de Zn y 69 542.82 mg/kg de Zn respectivamente en la segunda semana. Estos resultados (concentración-efecto) pueden deberse a que los efectos que se están presentando sean el resultado de las características fisicoquímicas de las muestras (pH, Capítulo 2) en conjunto con los metales, y no solo a las altas concentraciones de estos elementos con potencial tóxicos, además, los residuos mineros contienen una amplia variedad en composición, a diferencia de los suelos artificiales; en donde estos primeros no están generando efectos letales pero sí efectos de otro tipo como de comportamiento, en donde las lombrices evaden los residuos mineros, debido a que estos pueden afectar alguna de sus actividades biológicas.

Grumiaux y colaboradores (2010) realizaron una prueba de exposición con lombriz de tierra *E. andrei* sobre un suelo contaminado con metales, en concentración de 13 ± 1 , 34 ± 1 , 822 ± 24 y $1\ 159 \pm 10$ mg/kg de Cd, Cu, Pb y Zn



respectivamente, con pH de 7.6, obteniendo a los 14 días un aproximado a 28% de letalidad, mientras que en el sitio problema de Charcas con pH promedio de 7.58 se obtuvo un 4% de letalidad con concentraciones superiores a las reportadas por Grumiaux, y con pH promedio de 4.21 el sitio problema de Cerro de San Pedro generó un 36.5% de letalidad. Las concentraciones cuantificadas para los sitios problemas se encuentran totalmente por encima de lo reportado por Grumiaux, no obstante, el porcentaje de letalidad se encuentra cercano al sitio de Cerro de San Pedro.

Spurgeon y colaboradores (1994), realizaron pruebas de letalidad con lombriz de tierra *E. fetida* expuestas a suelos adicionados con metales pesados (Cd, Cu, Pb y Zn) a diferentes concentraciones. A concentración de 300 mg/kg de Cd obtuvieron 2% de letalidad, con 200 y 1 000 mg/kg de Cu obtuvieron 0% y 82% de letalidad y con 10 000 mg/kg de Pb y Zn obtuvieron 100% de letalidad, para todos en el día 14, mientras que en los sitios problema que registraron letalidad (Cerro de San Pedro y Charcas) se obtuvo 36.5% y 4% de letalidad a concentraciones de 169.76, 7013.80, 5419.67 mg/kg de Cu, Pb y Zn respectivamente para Cerro de San Pedro; y 466.29, 9 069.23, 34 939.03 y 69 542.83 mg/kg de Cd, Cu, Pb y Zn respectivamente para Charcas. De forma reiterada se hace notar que los metales pesados pueden provocar mayor efecto al formar enlaces únicamente con las partículas del suelo, contrario a que los residuos sólidos de mina contienen diferente composición química la cual puede estar favoreciendo los efectos no letales.

Por lo anterior se consideran tres causas: la primera, las muestras se mezclaron con *peat moss* para disminuir los efectos en las lombrices (la concentración real es interferida por la materia orgánica adicionada), de esta forma se priorizó los efectos no letales; la segunda, algunos de los componentes de la mezcla de elementos puede estar en formas no accesibles para los organismos expuestos, la forma química de los elementos produce efectos sinérgicos que están mitigando el efecto potencial de los elementos tóxicos, entre otros, y en consecuencia, están afectando a nivel conductual, por esta razón, en los bioensayo

de migración las lombrices evaden a más del 97% de los residuos sólidos de mina, igualmente, se puede estar ocasionando efectos subletales a nivel fisiológico y genético; y la tercera causa, puede deberse al pH en las muestras, el cual está interfiriendo o favoreciendo la movilidad y disponibilidad de los elementos tóxicos, como en el caso del sitio problema de Cerro de San Pedro, el cual se caracteriza por su condición ácida, dicha condición se encuentra directamente relacionada con la liberación de algunos metales y por consiguiente permite la presencia de efectos letales.



3.8 CONCLUSIÓN

El bioensayo de mortalidad registró para todos los sitios de referencia y control un 100% de supervivencia, mientras que para los residuos de mina de Cerro de San Pedro y Charcas se registró con un 63% y 96% de supervivencia respectivamente, pudiéndose deber el efecto de letalidad a la liberación de metales a partir de las condiciones ácidas que presenta el primer sitio, y a las elevadas concentraciones de metales en este segundo sitio, las cuales se encuentran por encima de los otros sitios. Según los resultados reportados por otros autores, el efecto de letalidad se encuentra poco discutible entre los artículos citados, debido a que no es lo mismo un suelo contaminado a un suelo contaminado de forma artificial, aunado a esto, la adición de materia orgánica pudo interferir en los posibles efectos letales. Por lo anterior se decidió reportar la pérdida de peso en las lombrices expuestas al bioensayo de mortalidad, resultando que para todos los sitios de estudio, la muestra problema representa mayor pérdida de peso en las lombrices, con respecto a las lombrices expuestas a la muestra de referencia.

La prueba de comportamiento basada en la migración de los organismos expuestos, mostró que para todos los sitios la mayoría de las lombrices prefirieron desplazarse al control negativo, debido a que está conformado por materia orgánica, constituyendo el medio adecuado para su desarrollo de forma natural, en segundo lugar, migraron a los suelos de referencia, y por último, de forma general no inmigraron a los residuos mineros.

Por lo tanto, los resultados de pérdida de peso y la prueba de migración muestran mayor representatividad. Con base a los resultados obtenidos, se concluye que pese a que no se registró la mortalidad representativa de las muestras, sí se registró mayor pérdida de peso en las lombrices expuestas a los residuos sólidos de mina, al igual que las lombrices lo evadieron, lo que nos permite inferir que estos residuos no tienen las condiciones necesarias para que la biota del edafón pueda desarrollarse, y por lo tanto, llevar a cabo sus funciones con importancia ecológica.

3.9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alejo, A. P., Romero, Á. H., Luna, J. L., & Díaz, M. d. C. C. (2012). Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con lombrices. In M. d. C. C. Díaz, G. E. Reyes, C. A. I. Hernández, & A. M. Cantú (Eds.), *Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos* (pp. 135). México: SEMARNAT-INE.
- Byung-Tae, L., Kyung-Hee, S., Ju-Yong, K., & Kyoung-Woong, K. (2008). *Progress in earthworm Ecotoxicology*. In Y.J. Kim & U. Platt (eds.). 2008. *Advanced Environmental Monitoring*, Springer. Republic of Korea, 248 – 258.
- Conder, J. M., & Lanno, R. P. (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia foetida*. *Bioavailability*, 3 (1), 13-20.
- Cristense, O. M., & Mather, J. C. (1994). *Earthworms as ecological tests-organisms. Technical report Danish Environmental Protection Agency*. Copenhagen, Denmark, p. 99.
- Espinoza-Navarro, O., Ferreira, C. & Bustos-Obregón. (2013). *Effect of methamidophos on the morphology and male reproductive parameters of the earthworm Eisenia foetida*. *Int. J. Morphol.*, 31(3), 1097-1103.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2015). *Propiedades del suelo*. Recuperado de <http://www.fao.org/home/es/>
- Gaete, H., Hidalgo, M. E., Neaman, A., & Ávila, G. (2009). Evaluación de la toxicidad de cobre en suelo a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *Eisenia foetida*. *Quim. Nova*, XY(00), 1-5.
- Grumiaux, F., Demuyne, S., Schikorski, D., Lemièrre, S., & Leprêtre, A. (2010). Assessing the effects of FBC ash treatments of metal-contaminated soils using life history traits and metal bioaccumulation analysis of the earthworm *Eisenia andrei* *Chemosphere*, 79, 156–161.



- Kim, S. W., Chae, Y., Kwak, J. I., & An, Y.-J. (2016). Viability of gut microbes as a complementary earthworm biomarker of metal exposure. *Ecological Indicators*, 60, 377–384.
- Nies, D.H. (1999). *Microbial heavy-metal resistance*. En Tania Volke Sepúlvera, et al. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). (1984). *Earthworm, acute toxicity tests*. Guideline for testing of chemicals (207), p.9.
- Otomo, P. V. (2011). *Stress responses of Eisenia andrei and Enchytraeus doerjesi (Oligochaeta) to combined effects of temperature and metal contamination* (Doctor), University of Stellenbosch.
- Palafox, A. A., Hernández, R. Á., López, L. J., & Cuevas, D. M. (2012). *Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con lombrices*. In M. d. C. C. Díaz, G. E. Reyes, C. A. I. Hernández, & A. M. Cantú (Eds.), Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos. Universidad de Veracruz: SEMARNAT-INE, p. 107-125.
- Scroggins, R. (2004). *Biological test method: Tests for toxicity of contaminated soil to earthworms (Eisenia andrei, Eisenia fetida, or Lumbricus terrestris)*. Environmental Technology Center. Ottawa, Ontario. Canada.
- Spurgeon, D. J., Hopkin, S. P., & Jones, D. T. (1994). Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems *Environmental Pollution*, 84, 123-130.
- Volke, S. T., Velasco, T. J. A. & De la Rosa, P. D. (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México, D. F., p.43.

CAPÍTULO 4. EVALUACIÓN GENOTÓXICA:

ENSAYO COMETA

INTRODUCCIÓN

Como se mencionó en los capítulos previos, la actividad minera es una de las actividades que genera mayor impacto al ambiente, ya sea de manera directa (remoción de vegetación y pérdida de suelo) o indirecta (generación de residuos depositados a cielo abierto). Los residuos depositados a cielo abierto y expuestos al intemperismo favorecen que exista dispersión de metales y éstos pueden representar riesgo a la salud humana y a la biota. Una manera de evaluar la toxicidad de las matrices ambientales (suelo, sedimento, agua, etc.) es a través de bioensayos o ensayos de toxicidad, estas pruebas consisten en recolectar muestras de un sitio problema y trasladarlas al laboratorio para exponer a organismos que se encuentran bajo condiciones controladas, como se mencionó en el capítulo 3. Uno de los organismos que han demostrado ser excelentes biomonitores de la toxicidad del suelo son las lombrices de tierra. Posteriormente de que los organismos son expuestos a la matriz ambiental se pueden evaluar respuestas biológicas sutiles que no necesariamente derivan en la muerte de los organismos expuestos. Estas respuestas sutiles se evalúan mediante biomarcadores. Los biomarcadores miden la interacción entre un sistema biológico y un agente químico; evaluando la respuesta funcional o fisiológica a nivel celular o molecular. Los biomarcadores se diferencian en tres tipos: (i) exposición, evalúa las células y moléculas de organismos en presencia de estresores ambientales; (ii) efecto, evalúa la alteración bioquímica, fisiológica o de comportamiento producida en el organismo que puede ser asociada con una enfermedad; y (iii) susceptibilidad, evalúa la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición a una sustancia xenobiótico. Dentro de los biomarcadores de exposición se encuentra la cuantificación de metales y As en tejido por el método analítico de ICP-masas; en el presente trabajo de investigación se reportan los resultados de exposición generados por un estudio de toxicidad en lombriz que derivo de las pruebas de toxicidad realizados para el presente. Dentro de los biomarcadores de efecto se consideran las modificaciones en las funciones fisiológicas, alteraciones en la actividad enzimática, daños genotóxicos como aparición de aductos y



modificaciones en la composición celular del ADN, entre otras (Repetto & Repetto, 2009; Arango, 2012), esto nos permite conocer los efectos en organismos individuales.

El ensayo cometa es un biomarcador de efecto, el cual se recomienda utilizar en exposición subaguda (exposición menor a 31 días) debido a que su principal uso es como un biomarcador preventivo, sin embargo también es utilizado para pruebas de exposición crónica. Este biomarcador refleja cuantitativamente el efecto genotóxico generado por los estresores ambientales. Se realiza sobre células individuales por electroforesis en gel, su uso es rápido, simple, seguro y en comparación con otras técnicas es de bajo costo; permite determinar el daño al ADN y la respuesta a este daño en células individuales (Fairbairn, 1995; Yuquan *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 1997; Kumaravel *et al.*, 2009). Las ventajas de esta prueba incluyen: compilación de datos a nivel de células individuales que permiten un análisis estadístico sólido, el uso de una pequeña cantidad de células por muestra, sensibilidad para detectar el daño al ADN, uso de célula eucarionte *in vivo* o *in vitro* (Kumaravel *et al.*, 2009) y es un biomarcador no destructivo; igualmente es utilizado para determinar la eficiencia de las células para reparar el daño al ADN (Collins, 2004), además, es un biomarcador no específico (Yuquan *et al.*, 1997), lo que permite evaluar el potencial tóxico de sitios impactados con mezclas de contaminantes. Para que un compuesto genotóxico provoque alguna respuesta a nivel celular o bioquímico, es necesario que esté biodisponible (existen varios procesos biológicos que afectan la biodisponibilidad basada en la absorción, distribución y metabolismo del genotóxico) y debe hacer enlaces covalentes con las macromoléculas celulares, incluido los ácidos nucleicos y proteínas (Collins *et al.*, 1997; Shugart, 2000). La genotoxicidad que generan los estresores ambientales como los metales pesados y As, regularmente se basa en aductos en la molécula de ADN, lo cual consiste en el debilitamiento de uniones entre bases nitrogenadas o nucleótidos. Con la formación de estos sitios álcali lábiles, las células intentan reparar estas lesiones con la enzima endonucleasa, la cual elimina las bases nitrogenadas o nucleótidos dañados y los reemplaza con similares, por lo tanto, a mayor lesión o nivel de reparación, mayor

será el grado de ruptura en el campo electroquímico de la electroforesis (Collins, *et al.*, 1997; Collins, 2004) para así medir la fragmentación del ADN.

4.1 METODOLOGÍA

La metodología que se utilizó para medir el daño al ADN en lombrices fue la propuesta por Singh *et al.*, (1988) adaptada en González-Mille *et al.* (2012) en el capítulo cuarto «Ensayo cometa en fauna terrestre» del libro publicado por SEMARNAT-INE «Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos».

4.1.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se han encontrado referencias que indican que el tiempo de exposición de las lombrices de tierra que serán utilizadas para pruebas de genotoxicidad debe ser de entre 7 a 14 días (Ramírez & Mendoza, 2008), mientras que autores como Lourençon *et al.* (2010) han demostrado que se puede obtener efectos genotóxicos a partir de las 24 h de exposición. Por lo anterior se decidió utilizar una lombriz por cada duplicado del bioensayo de letalidad con duración de 14 días de exposición, estas lombrices se utilizaron en el instante en que se sacaban de los frascos. De cada lombriz se obtuvo fluido celómico y se contaron 100 células individuales para determinar el nivel de fragmentación en el ADN las células de lombriz. Al finalizar la obtención de células de lombriz se continuó con la etapa final del bioensayo de letalidad hasta la obtención del peso de las lombrices, una vez finalizado lo anterior, las lombrices se colocaron en frascos ámbar etiquetados y se congelaron a -20°C para su posterior cuantificación de metales y As en tejido de lombriz.

4.1.2 BIOMARCADOR DE EXPOSICIÓN

Este biomarcador fue realizado por Anaya (en proceso), a partir de las muestras de lombriz resultantes en la prueba de toxicidad realizada para el presente estudio de investigación, por tal motivo solo abordaré la información y datos relevantes que se ha generado hasta el momento.



El método consistió en descongelar las muestras de lombrices para colocar cada muestra en charolas de plástico, se registró el peso inicial y se colocó en el horno de secado a 40°C, registrando el peso cada 24 h hasta obtener un peso constante. Posteriormente se colocaron las muestras secas en tubos cónicos y se trituraron. Enseguida se realizó una pre-digestión que consistió en colocar las muestras en vasos de teflón para digerir con 10 ml de ácido nítrico y 2 ml de peróxido dejándose reposar durante 24 h, pasado el tiempo de pre-digestión se colocaron las muestras en el horno de digestión en tres ciclos de 15 min cada uno a 200 psi. Posteriormente las muestras se colocan en tubos cónicos para cuantificar los metales y As por el método analítico de espectrofotometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo, ICP-masas (Anaya, en proceso).

4.1.3 GENOTOXICIDAD (ENSAYO COMETA)

El método consistió en preparar previamente el número necesario de portaobjetos con una película de agarosa regular (Figura 27), para ello, previamente se dejó los portaobjetos nuevos en alcohol etílico por lo menos 15 minutos, se sacaron del alcohol y se secaron con la ayuda de papel absorbente, después se rotularon sobre el lado esmerilado. Posteriormente, dentro de un matraz, se preparó la solución con 0.075 g de agarosa regular y 12.5 mL de agua desionizada, se colocó en una parrilla de agitación a una temperatura que no favorezca el punto de ebullición, una vez preparado lo anterior, se colocó 150 µL de la agarosa en cada portaobjetos, y con las manos adecuadamente lavadas se deslizó el dedo índice sobre el volumen de agarosa cubriendo toda el área sin esmerilado, por último se colocó en un horno de secado a 36 °C, hasta que la película de agarosa quedó completamente seca.

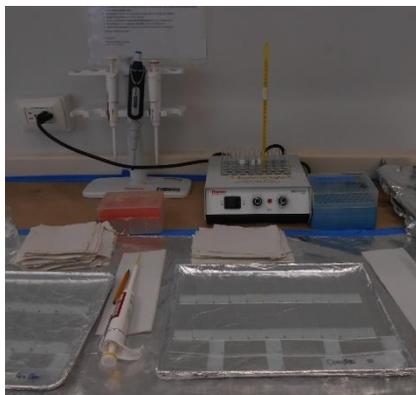


Figura 27. Preparado de portaobjetos con Agarosa Regular.

Realizado los pasos mencionados anteriormente, se extrajo una lombriz por cada frasco ámbar; una a la vez para no aumentar el estrés en los organismos. Se lavó la lombriz con agua purificada comercialmente y con agua desionizada, se secó con papel absorbente y se colocó dentro de un tubo eppendorf de 2 mL con 150 μ L de medio de cultivo RPMI 1640 (Figura 28) para realizar la extracción de fluido celómico con una aguja de insulina, a partir de dos punciones sobre el clitelo en un tiempo de 2 min (Figura 29), pasado el tiempo se retiró la lombriz.



Figura 28. Tubo Eppendorf con Medio de Cultivo RPMI 1640 y con lombriz.

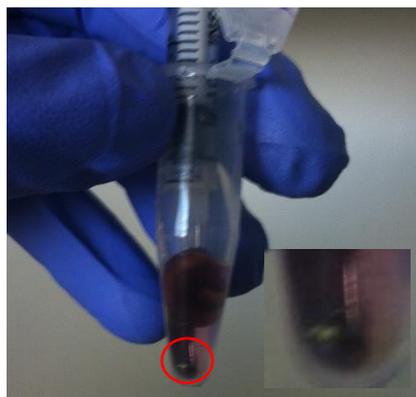


Figura 29. Fluido celómico a partir de la punción sobre el clitelo.

Posteriormente el medio de cultivo con el fluido celómico se homogenizó en un vórtex durante 5 s (Figura 30), se tomó una alícuota de 30 μ L (Figura 31) para diluirla con 200 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (B. P. F.), y se homogenizó nuevamente con un vórtex durante 5 s.



Figura 30. Homogenizado de fluido celómico y Medio RPMI 1640



Figura 31. Alícuota de homogenizado del Medio de Cultivo y el celoma de lombriz.

Se tomó una alícuota de 75 μ L para colocarla sobre un portaobjeto, inmediatamente se colocó un cubreobjetos, para formar una película delgada y uniforme de celoma (célula de lombriz) con agarosa de B. P. F. (Figura 32), y se colocó a 4 °C entre 10 a 20 min para gelificar la agarosa que embebe las células.

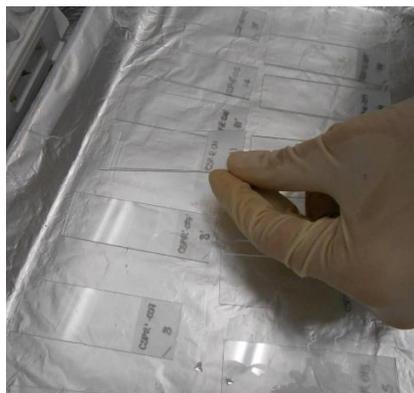


Figura 32. Portaobjetos con capas de Agarosa Regular.

Pasado el tiempo de gelificar, se retiró cuidadosamente el cubreobjetos, sin retirar la película de agarosa que embebe las células, y sobre esta se colocó 75 μ L de agarosa de B. P. F., se colocó nuevamente un cubreobjetos para ser llevado a refrigerar por el mismo lapso de tiempo (Figura 33).

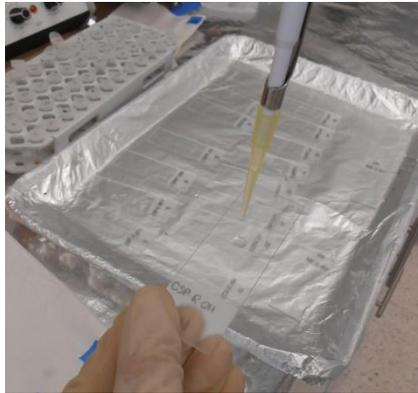


Figura 33. Película delgada de agarosa con celoma.

Los portaobjetos, sin olvidar retirar el cubreobjetos, se dispusieron dentro de un vaso de coplin con solución de lisis (Figura 34) esta solución consta de alto contenido de sales y detergentes; se preparó con cloruro de sodio (NaCl), Trisma Base, hidróxido de sodio (NaOH), Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Tritón 100 X y Dimetilsulfóxido (DMSO), y se refrigeró a 4 °C, por lo menos una hora. El Triton es un detergente que puede lisar las células, el DMSO evita el daño al ADN inducido por radicales libre (Tice *et al.*, 2000). Toda la solución de lisis rompe la membrana celular y nuclear (lisado) para dejar expuesto el material genético, también mantiene la estabilidad de la agarosa.



Figura 34. Vasos de Coplin con solución de lisis.

Pasado el tiempo para ruptura de la membrana celular, se realizó la electroforesis, esto consistió en trabajar dentro de un laboratorio o cuarto frío con temperatura de 4 °C y en oscuridad; únicamente se ilumina con una luz amarilla que



se colocó indirectamente al área de trabajo (Figura 35), en ningún momento se iluminó directamente los portaobjetos con células embebidas; en esta etapa las células son fotosensibles. Sobre una mesa se colocó la cámara de electroforesis debidamente nivelada y dentro de ella se vertió la solución de electroforesis que constó de EDTA, NaOH a 10 N y agua desionizada, con pH de 13 para desdoblar la cadena de doble hélice del ADN, los portaobjetos se colocaron en dirección del cátodo al ánodo dentro de la cámara (Figura 36), y se dejaron permanecer únicamente sumergidos durante 5 min, para que el ADN se desenrollara (Figura 37), cumplido este tiempo, se conectó la cámara a la fuente de poder y se programó a 25 V, 300 A y 5 min (Figura 38), y se inició la electroforesis por el tiempo indicado (Figura 39). En el periodo de electroforesis, las cadenas de ADN desenrolladas que no presentaron daño se dispersaron muy levemente de forma circundante por efecto de la membrana celular desgastada en conjunto con la aplicación del voltaje y amperaje. Dependiendo del daño que presentó el ADN, fue la migración que se obtuvo en sentido del cátodo hacia el ánodo. La migración que se observó, corresponde a la ruptura en la doble cadena del ADN de la lombriz a partir de secciones álcali-lábiles (Collins *et al.*, 1997; Speit & Hartmann, 2012).



Figura 35. Área de trabajo dentro del cuarto frío.



Figura 36. Preparación de los portaobjetos dentro de la cámara de electroforesis.

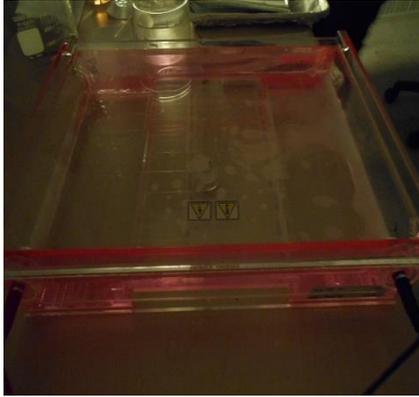


Figura 37. Portaobjetos en los 5 min de desenrollado de las cadenas de ADN.



Figura 38. Electroforesis en curso (la espuma indica que el equipo está corriendo correctamente).



Figura 39. Programación de la fuente de poder.

Al finalizar la electroforesis, se retiran los portaobjetos de la cámara para colocarlos en una charola, en esta se realizan los lavados con precaución para no levantar las células embebidas. Primero se realizaron dos lavados con trisma base que es utilizado para remover el detergente residual y neutralizar las laminillas, eliminando las sales de la solución de electroforesis (Tice *et al.*, 2000), utilizando una pipeta Pasteur con bulbo se dejó deslizar suavemente y de forma indirecta la solución sobre el portaobjetos para permanecer cubiertos con este fluido durante 5 min en cada lavado, con el objetivo de retirar todo residuo celular que no se fija. Después, de la misma forma y con los mismos tiempos, se realizaron dos lavados con etanol para fijar las células; en esta etapa las células dejan de ser fotosensible. Finalmente, los portaobjetos se dejan sumergidos durante 5 min en vasos de coplin con etanol para finalizar el fijado. Finalizado el tiempo, pos portaobjetos se retiran



de los vasos de coplin y se dejan secar para almacenarlos en cajas para portaobjetos (Figura 40).



Figura 40. Caja con los portaobjetos con células fijadas.

Para medir el daño al ADN, los portaobjetos con células fijadas son teñidas con 25 μ L de bromuro de etidio a 0.05 mM, para que las células emitan fluorescencia con un haz de luz ultravioleta (UV), enseguida son cubiertos con un cubreobjetos. Existen numerosos paquetes de softwares que son utilizados para medir la fluorescencia entre ellos está el «Komet v 4.0», que se utilizó en el microscopio de fluorescencia (Nikon, Y-FL). Este software proporciona varios parámetros, entre los que están el *Olive Tail Moment (OTM)* y el *Tail Length*, ambos parámetros son los más comúnmente utilizados para conocer el potencial genotóxico al que se exponen los seres vivos de prueba toxicológicas (Collins, 2004; Kumaravel, *et al.*, 2009). El *OTM* es el producto de la longitud de la cola y el porcentaje de ADN en la cola, como un indicador del ADN que migró, el *Tail Length* es la intensidad del ADN en la cola, la cual disminuye en células muy dañadas (Tice *et al.*, 2000; Lee & Steinert, 2003; Gonzáles-Mille *et al.*, 2012)

. Las células que no presenten daño mostrarán lecturas bajas de estos parámetros debido a que las células en condiciones normales contienen el ADN enrollado en el núcleo, por lo tanto no existe la amplia dispersión que forma una cola. Ambos datos obtenidos con el software son utilizados ampliamente para interpretar el nivel de daño de cada célula medida (Collins 2004; Ramírez & Mendoza, 2008; Gonzáles-Mille *et al.*, 2012). Es importante mencionar que la

medición del daño al AND a partir de lecturas en células dañadas por la técnica del ensayo cometa, no cuenta con estándares para considerar que a partir de un valor específico una célula se puede considerar dañada.

4.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el software *STATISTICA* en su versión 10 (2011). Los datos que corresponden a este capítulo tienen distribución no normal según la prueba de *Shapiro-Wilk's W*, por lo tanto se ejecutaron pruebas no paramétricas. Se crearon gráficas *Box-Whiskers* para comparar los rangos de cada muestra independiente por grupo, así mismo, se ejecutó la prueba *Kruskal-Wallis* para determinar la diferencia estadísticamente significativa entre estas muestras agrupadas y el control negativo, a un nivel de significancia del 95% que corresponde a *p*-valor de 0.05. Por último, se realizó una prueba de asociación con la prueba *Sperman Rank R* con significancia de 0.05 y una prueba de componentes principales basado en la correlación de las variables medidas.



4.3 RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados de daño al ADN en lombrices de tierra expuestas a las muestras de suelo de referencia, residuo (sitio problema) y sustrato control de cada uno de los sitios evaluados.

4.3.1 BIOMARCADOR DE EXPOSICIÓN

En la Tabla 7 se muestran los resultados de un trabajo paralelo al nuestro en el que se determinaron las concentraciones de metales y As en tejido de lombrices expuestas a residuos sólidos de mina y a suelos de referencia (Anaya- González, en proceso). Se determinó la presencia de algunos metales y As, lo que nos indica que se encontraban en una forma química biodisponible y bioaccesible para la lombriz, y por esta razón se pudieron generar algunas respuestas biológicas en el organismo de prueba. Además de forma general se comparó las concentraciones de estos elementos, en donde se halló que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en As y Pb entre las muestras de referencia y problema.

Tabla 7. Concentración de metales y As en lombriz.

| SITIO | MUESTRA | CONCENTRACIÓN DE METALES | | | | |
|-----------------------|------------|--------------------------|-------|-------|----------------------|--------|
| | | As | Cd | Cu | Pb | Zn |
| CEDRAL | REFERENCIA | 1.50 ^a | 0.00 | 0.00 | 3.55 ^a | 0.00 |
| | PROBLEMA | 173.51 ^b | 0.00 | 0.00 | 569.91 ^b | 0.01 |
| CERRO DE SAN PEDRO | REFERENCIA | 1.10 ^a | 0.00 | 0.00 | 3.54 ^a | 0.00 |
| | PROBLEMA | 20.22 ^b | 0.00 | 0.00 | 304.66 ^b | 0.01 |
| CHARCAS | REFERENCIA | 1.18 ^a | 0.00 | 0.00 | 6.44 ^a | 0.00 |
| | PROBLEMA | 291.39 ^b | 0.00 | 0.00 | 2699.58 ^b | 0.13 |
| VILLA DE LA PAZ | REFERENCIA | 5.88 ^a | 1.14 | 1.37 | 3.64 ^a | 6.99 |
| | PROBLEMA | 880.60 ^b | 20.40 | 56.49 | 95.99 ^b | 250.68 |

^{a, b} Indican diferencias estadísticamente significativa.

4.3.2 BIOMARCADOR DE EFECTO

CEDRAL

Se determinó que estadísticamente el OTM del sitio contaminado es diferente ($p < 0.05$) con el sitio de referencia y el control, mientras que debido a la amplia distribución de valores no existe diferencia ($p > 0.05$) en TL entre el sitio de referencia comparado con el control y el sitio problema (Figura 41 y 42), pero sí hay diferencia entre el sitio problema y el control; correspondiendo a los valores medios de 3.56 de OTM y 9.51 de TL en el sitio de referencia, 5.66 de OTM y 14.32 de TL en el sitio problema; 2.07 de OTM y 5.04 de TL en el control. Sin embargo, los valores de efecto muestran que el sitio problema representa el mayor daño, seguido del sitio de referencia y el control, por tal razón, no se debe considerar que el efecto generado es igual entre el sitio de referencia y el problema.

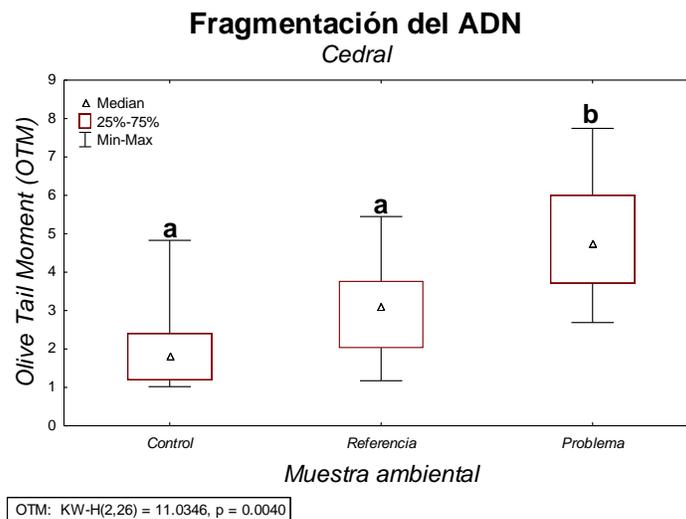


Figura 41. Diferencia estadística del OTM en Cedral: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis).

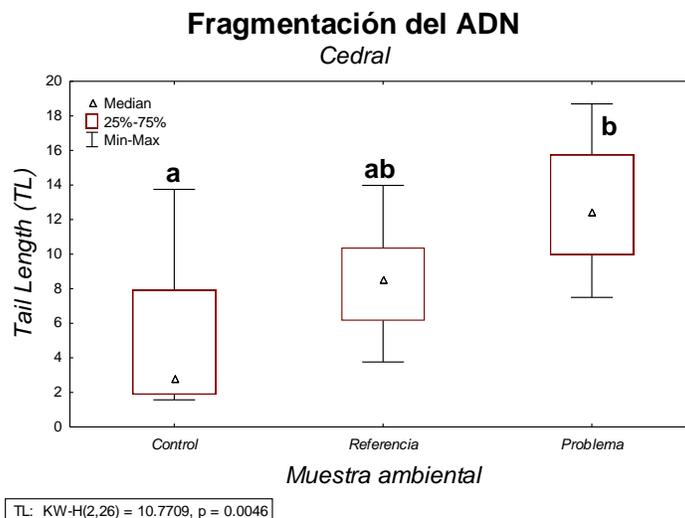
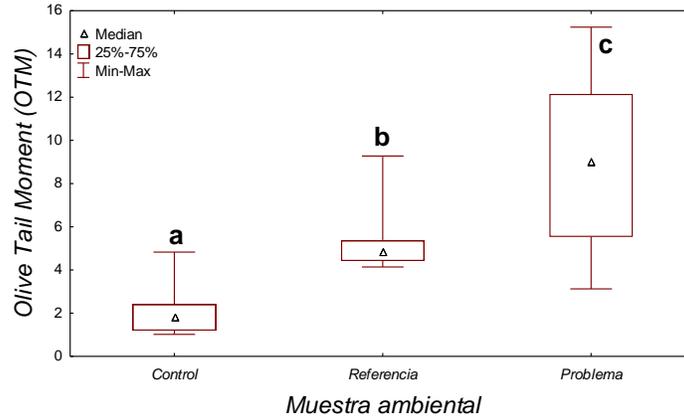


Figura 42. Diferencia estadística del TL en Cedral: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis).

CERRO DE SAN PEDRO

Se obtuvo diferencia estadística ($p < 0.05$) en OTM entre el sitio de referencia, el sitio problema y el control (Figura 43 y 44), mientras que en TL no hubo diferencia estadística ($p > 0.05$) entre el sitio de referencia y el problema, pero si la hubo entre los sitios y el control; correspondiendo a los valores medios de 5.28 de OTM y 15.31 de TL en el sitio de referencia, 8.98 de OTM y 22.68 de TL en el sitio problema; 2.07 de OTM y 5.04 de TL en el control. Es importante señalar que la variabilidad de los datos generados es amplia y por este motivo no se aprecia una diferencia estadística entre los sitios de muestreo en TL; sin embargo, los valores dados mostraron una tendencia en donde el sitio problema representan el mayor daño por las altas concentraciones que se mencionan en el Capítulo 2, entonces pese a que no se distinga diferencia estadística, se debe tener presente que los efectos no son iguales entre el ambos sitios.

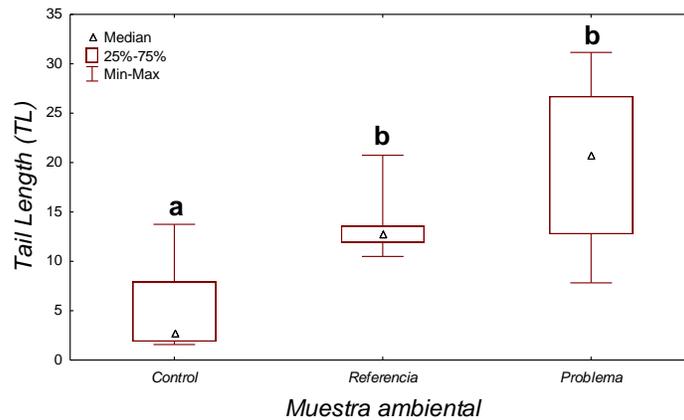
Fragmentación del ADN Cerro de San Pedro



OTM: KW-H(2,27) = 16.5921, p = 0.0002

Figura 43. Diferencia estadística del OTM en Cerro de San Pedro: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis).

Fragmentación del ADN Cerro de San Pedro



TL: KW-H(2,27) = 14.4731, p = 0.0007

Figura 44. Diferencia estadística del TL en Cerro de San Pedro: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis).

CHARCAS

Se encontró que existe diferencia estadística ($p < 0.05$) en los efectos obtenidos entre el control, sitio de referencia y sitio problema, correspondiendo a los valores medios de 6.44 de OTM y 13.44 de TL en el sitio de referencia, 9.90 de OTM y 19.93 de TL en el sitio problema (Figuras 45 y 46); 2.07 de OTM y 5.04 de TL en el control.

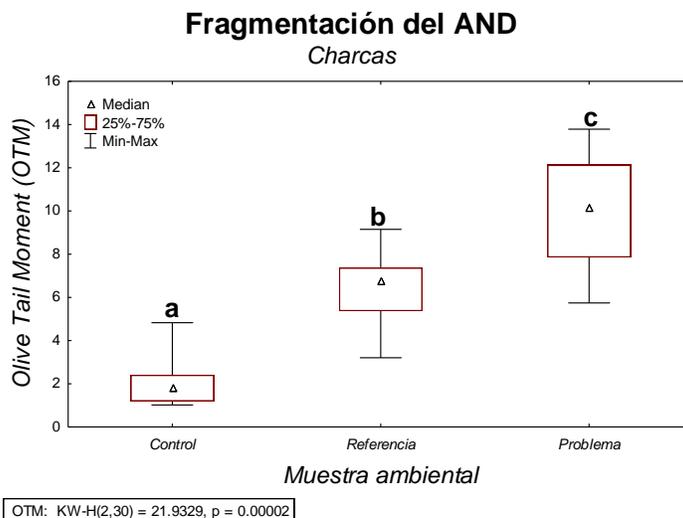


Figura 45. Diferencia estadística del OTM en Charcas: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis).

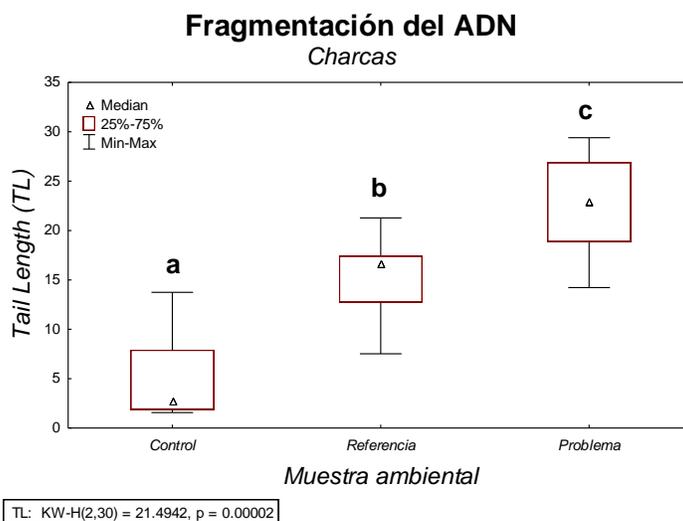


Figura 46. Diferencia estadística del TL en Charcas: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis).

VILLA DE LA PAZ

Se encontró que en OTM no existe diferencia estadística ($p > 0.05$) entre el sitio de referencia y el problema, pero sí existe diferencia entre el sitio problema y el control, mientras que para TL se obtuvo diferencia estadística ($p < 0.05$) entre los sitios de muestreo y el control (Figura 47 y 48); correspondiendo a los valores medios de 6.65 de OTM y 16.64 de TL en el sitio de referencia, 7.93 de OTM y 20.08

de TL en el sitio problema; 2.07 de OTM y 5.04 de TL en el control. Es importante señalar que existe una amplia distribución de los valores generados en los sitios de muestreo, por este motivo no se aprecia una diferencia estadística entre los sitios de muestreo; sin embargo, las gráficas mostraron una tendencia en donde el sitio problema representa el mayor daño.

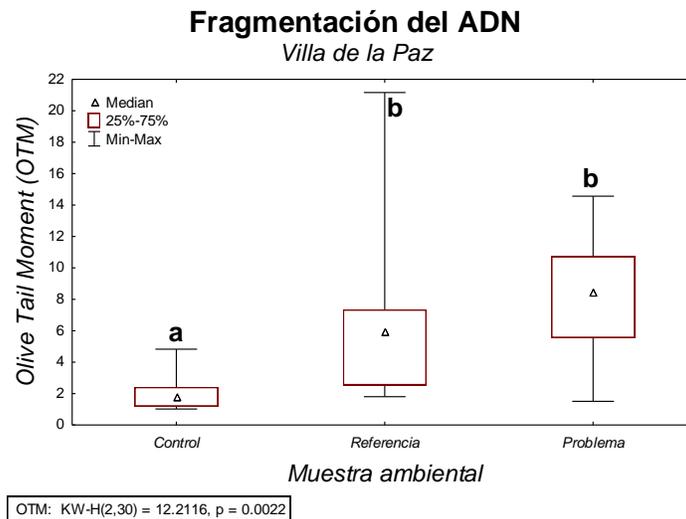


Figura 47. Diferencia estadística del OTM en Villa de la Paz: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis).

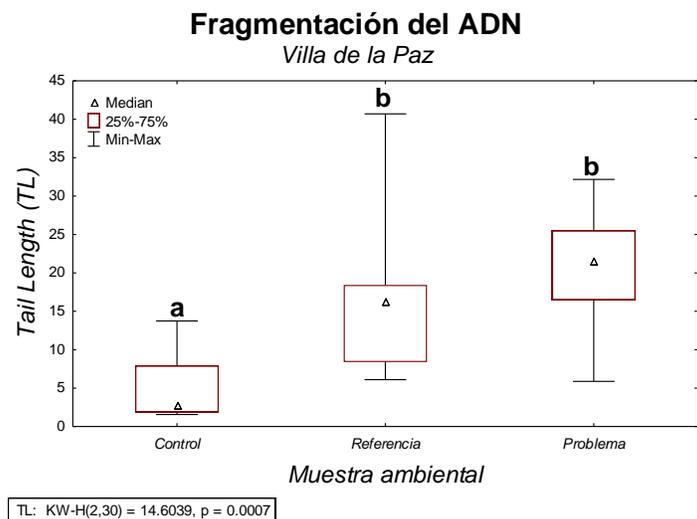


Figura 48. Diferencia estadística del TL en Villa de la Paz: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis).

En las Figuras de la 49 a la 50, se muestra la comparación entre medianas de los valores de OTM y TL para todos los sitios de referencia y en las Figuras 51 y 52

para los sitios problema, con diferencias estadística. Esta comparación permitió agrupar los sitios según los efectos encontrados por sus concentraciones basales y por las concentraciones de los residuos. En los datos agrupados de OTM y TL de los sitios de referencia y problema, todos los sitios de referencia se agrupan, dejando aislado al control, esto indica que el control cumplió con el objetivo de representar el menor efecto genotóxico, identificando que todos los sitios se agrupan para representar fragmentación en el ADN en diferente medida.

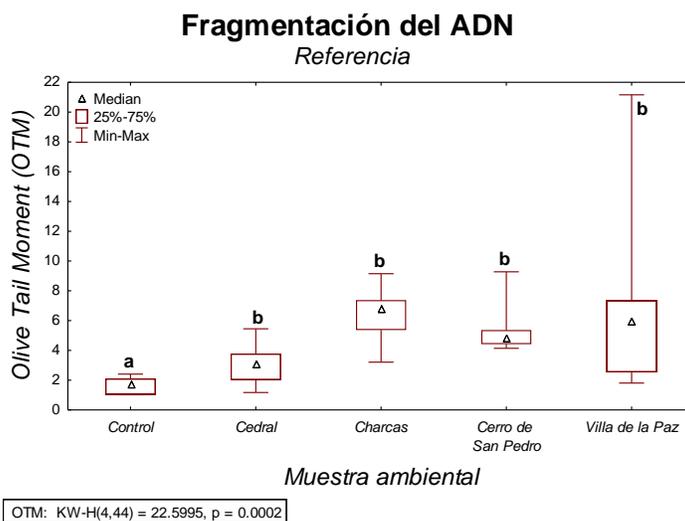


Figura 49. Diferencia estadística del OTM de todos los sitios: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis).

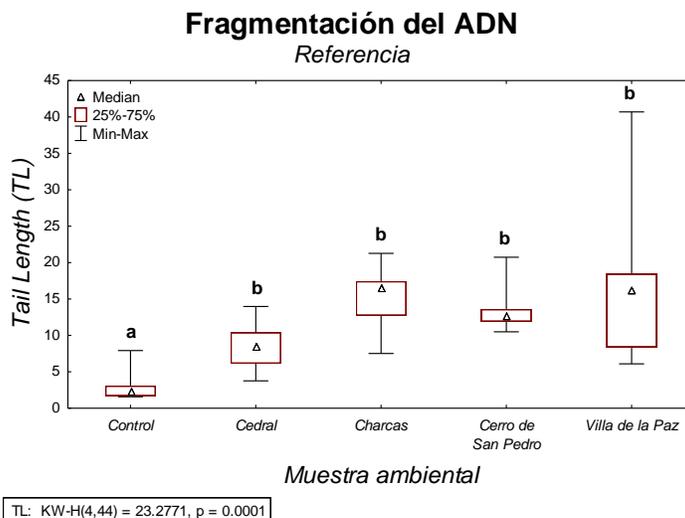


Figura 50. Diferencia estadística del TL de todos los sitios: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis).

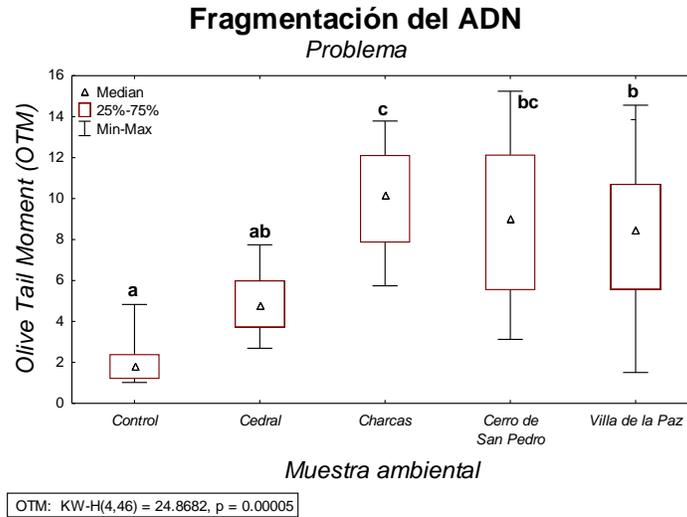


Figura 51. Diferencia estadística del OTM de todos los sitios: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis).

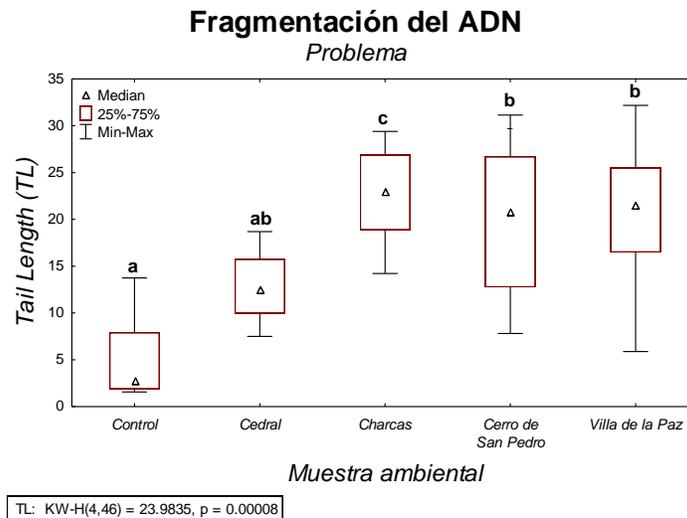


Figura 52. Diferencia estadística del OTM de todos los sitios: p-valor para toda la prueba (Kruskal-Wallis).

Por último, se muestran los datos logarítmicos de OTM y TL con la finalidad de presentar los valores de una forma más visual y representativa en graficas de variables múltiples agrupadas por la mediana. En las Figuras 53 y 54, se observan los valores de OTM y TL de los efectos generados por las muestras de referencia y problema, en ambas gráficas se diferencia que todos los valores de efecto están por encima de la prueba control; así como los sitios problemas se encuentran igualmente por encima de su respectivo sitio de referencia. Este condensado de



información que se desglosó con anterioridad, nos permite identificar el nivel de fragmentación del ADN de mayor a menor registrado en esta evaluación genotóxica de importancia ecológica, principalmente para los organismos invertebrados de la superficie del suelo. En ambas graficas se diferencia a Charcas con mayor efecto, seguido de Cerro de San Pedro, Villa de la Paz y Cedral con menor efecto, no obstante, los cuatro sitios pueden generar efectos genotóxicos pero a diferentes niveles.

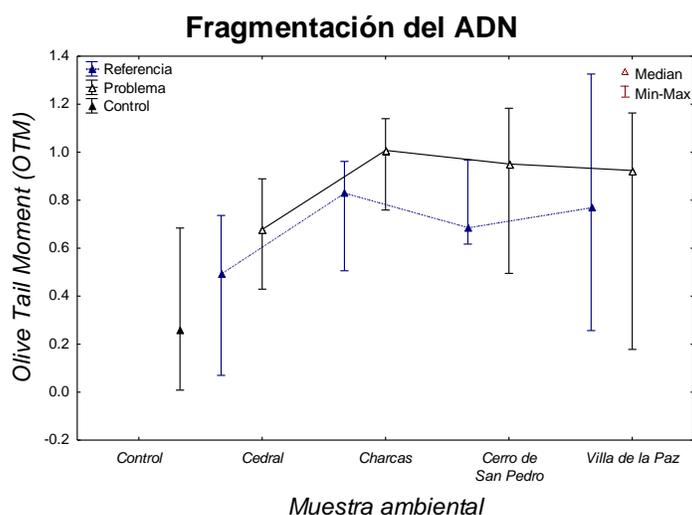


Figura 53. Gráfica múltiple de valores logarítmicos de OTM agrupados por la mediana de cada sitio.

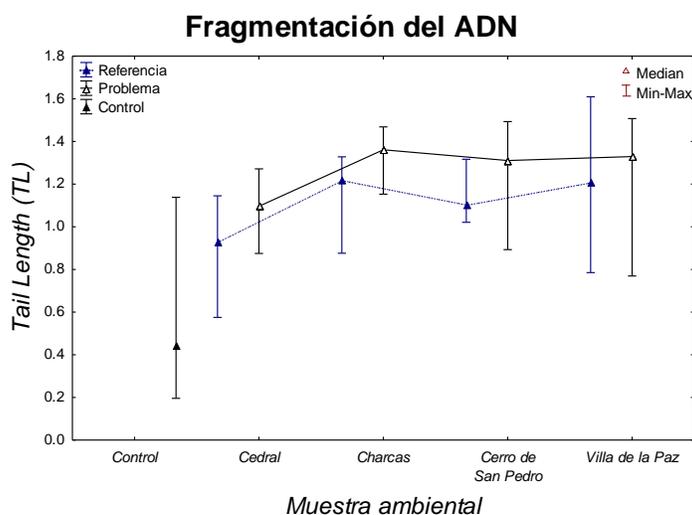


Figura 54. Gráfica múltiple de valores logarítmicos de TL agrupados por la mediana de cada sitio.

La US EPA (Buchman, 2008) nos proporciona concentraciones de seguridad para invertebrados, sin embargo, se requirió conocer la asociación que existe entre los efectos evaluados y las concentraciones de metales y As, además de la asociación con los parámetros fisicoquímicos medidos. Para ello, primero se calculó el índice de riesgo ecológico presentado como Sediment Quality Guideline Quotient (SQG-Q), en donde se considera una mezcla compleja de contaminantes (Long & MacDonald, 1988), que para este caso son las concentraciones de As, Cd, Cu, Pb y Zn, este índice nos permitió integrar los EPT de estudio, el cual consiste en las siguientes ecuaciones. En la Ecuación 2, *PEL* es la concentración por encima del cual se producen efectos adversos, en este caso corresponde a la concentración de seguridad para invertebrados; *contaminant* es la concentración de una muestra ambiental y *PEL-Q* es el cociente probable del nivel de efectos adversos por contaminante.

$$PEL - Q = \frac{\text{contaminant}}{PEL} \quad \text{Ecuación 2}$$

En la Ecuación 3, $\sum PEL-Q$ es la suma de *n* cocientes que corresponden a varios contaminantes, *n* es el número total de contaminantes con los que se generó la sumatoria de cocientes y SQG-Q es el índice de riesgo ecológico.

$$SQG - Q = \frac{\sum_{i=1}^n PEL-Q}{n} \quad \text{Ecuación 3}$$

Posterior a que se generó el índice para cada muestra, se realizó el análisis estadístico en el que se ingresó los valores de efecto (OTM y TL), los parámetros fisicoquímicos (CE y pH) y índice de riesgo ecológico (SQG-Q), para conocer si existe asociación entre los efectos con la CE, el pH y las concentraciones en índice de riesgo. Se obtuvo que existe asociación entre los efectos y las otras variables, existe 0.364 (OTM) y 0.358 (TL) de asociación con el SQG-Q, 0.374 (OTM) y 0.360 (TL) de asociación con la CE y -0.396 (OTM) y -0.383 (TL) de asociación con el pH. Esto nos indica que las variables analizadas sí están asociadas con los efectos, lo que nos dice que a mayor concentración de la mezcla de EPT, a mayor CE, y a menor pH, mayor será el efecto genotóxico.



Por último, se determinó el porcentaje de asociación de los componentes principales (Figura 55) asociación de efecto genotóxico medido-elementos, resultando que el factor coordinante 1 (Cd, Cu, Pb y Zn) se asocian en un 57.15%, mientras que el factor coordinante 2 (As y Ni) se asocian un 20.10% y entre ambos grupos se explica el 77.25% del efecto sub-lethal medido. Es importante resaltar que en este análisis estadístico el Pb está asociado a efectos genotóxicos, contribuyendo de esta forma a los estudios de genotoxicidad en lombrices asociadas a este metal, los cuales aún no son determinantes.

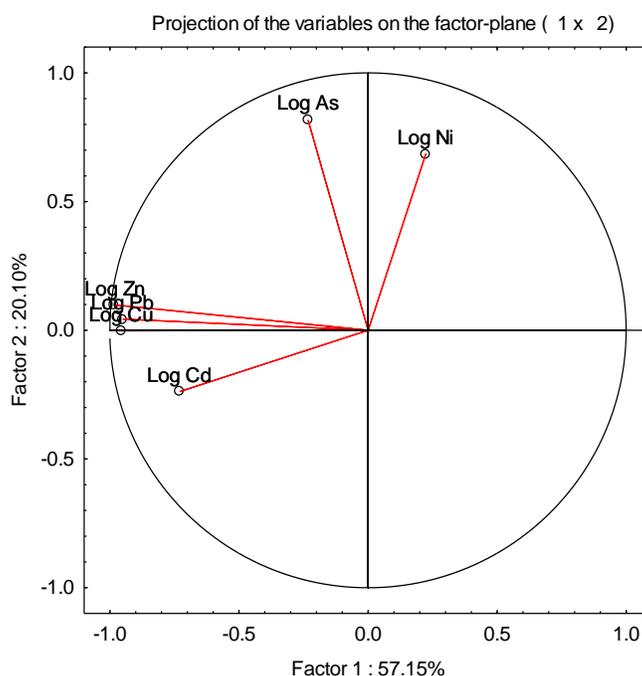


Figura 55. Factor coordinante de las variables, basado en la asociación genotoxicidad-elemento.

4.4 DISCUSIÓN

Jiang *et al.*, (2006) expusieron lombrices de tierra *E. andrei* a diferentes concentraciones de suelo contaminado con Cd durante 14 días, para determinar el potencial genotóxico a partir del ensayo cometa en células individuales, para ello, consideraron el valor de OTM; comenzando con la prueba control que registró 2.36 ± 1.23 de OTM, mientras que en el presente trabajo registramos valores similares (2.07 de OTM); a una concentración de 5 mg/kg de Cd obtuvieron 5.41 ± 2.94 de OTM, valor que es similar a los encontrados para los sitios de referencia de Charcas y Villa de la Paz a concentración de 6 mg/kg de Cd (valor asignado como límite de detección para ambos sitios) se registró 6.44 y 6.65 de OTM, respectivamente; a concentración de 10 mg/kg Jiang *et al.*, obtuvieron 9.01 ± 3.94 de OTM, mientras que en el sitio de referencia de Cerro de San Pedro (16.95 mg/kg de Cd) el valor fue de 5.28, resultando próximo a lo reportado por estos autores. A concentración de 50 mg/kg, encontraron que se ocasiona un OTM de 13.67 ± 3.52 , y en los sitios problemas de Cedral, Cerro de San Pedro y Villa de la Paz, así como en el sitio de referencia de Cedral, se obtuvo valores de OTM de 5.66, 8.98, 7.93 y 3.56 respectivamente, en concentraciones entre 31.18 a 39.96 mg/kg de Cd; mientras que el sitio problema de Charcas generó 9.90 de OTM (466.28 mg/kg de Cd), siendo el sitio que más se acerca al valor dado por estos autores en su máxima concentración. En las concentraciones mínimas de Cd, los resultados de OTM están dentro del rango de valores que presentan Jiang *et al.*, mientras que a concentraciones mayores, los resultados comienzan a perder semejanza, esto puede deberse a que los sitios de muestreo contienen otros elementos que pudieran estar interfiriendo en la bioaccesibilidad de los minerales metálicos, así como que la materia orgánica adicionada para realizar los bioensayos esté disminuyendo el efecto.

Otomo (2006) realizó varias unidades experimentales compuestas por diferentes concentraciones de Cd, en donde en cada una expuso 10 lombrices de tierra *E. fetida* durante 48 h, reportando que con 10 mg/kg obtuvo alrededor de 18 de OTM y 28 de TL, mientras que en los sitios problema en el estado de San Luis



Potosí se encontraron valores medios de OTM de 3.56 a 9.90 y TL de 14.32 a 22.68 en un rango de concentraciones medias de Cd entre 31.18 a 466.28 mg/kg, por lo tanto, la concentración utilizada por Otomo es inferior a las encontradas en los sitios con actividad minera del estado, pero generó mayor genotoxicidad sobre los celomocitos de lombriz, entonces, no se encuentra aparente concordancia entre los resultados obtenidos entre este autor y para los sitios problemas; sin embargo, esto puede deberse a la adición de materia orgánica en los residuos de mina para realizar los bioensayos con lombrices, disminuyendo de esta forma la exposición a los metales y metaloides, contrario a lo realizado por este autor, además que Zheng *et al.* (2013), mencionan que a mayor tiempo de exposición la fragmentación del ADN puede ir en decremento, esto puede deberse al proceso reparación celular y adaptación de los organismos a medios impactados.

Wang *et al.*, (2012) expusieron *E. fetida* a suelos artificiales contaminados con Cd-atrazina a diferentes tiempos de exposición (7, 14, 21 y 28 días) y diferentes concentraciones (0, 0.03, 0.3 y 3 mg/kg), reportando que la exposición de 3 mg/kg por 7 días se obtuvo 30 de OTM y por 14 días de 38 de OTM, mientras que en los sitios problemas obtuvimos valores de OTM entre 3.56 a 9.90 en concentraciones muy por encima, como se menciona previamente, igualmente se puede atribuir esta gran diferencia de efecto con respecto a la concentración dado que estos autores midieron el estrés combinado entre Cd-atrazina.

Wu *et al.*, (2012) realizaron pruebas de exposición con *E. fetida* en suelos artificiales adicionados con una mezcla de Cd y Pb en diferentes concentraciones (0 a 10 mg/kg de Cd adicionado con concentraciones de 5 a 500 mg/kg de Pb) durante 7 días, reportando efectos de 0.89 ± 0.09 a 2.25 ± 0.22 de OTM y 0.90 ± 0.07 a 1.61 ± 0.11 de TL; con respecto a la máxima concentración que corresponde a 10 mg/kg de Cd + 500 mg/kg de Pb, Wu *et al.*, obtuvieron 2.25 ± 0.22 de OTM 1.61 ± 0.11 de TL, mientras que en los sitios problemas se encontraron concentraciones superiores con efectos igualmente por encima de los reportados por estos autores. Por lo tanto, a menores concentraciones de metales pesado mayor es el estrés oxidativo que permite la fragmentación del ADN.

Zheng *et al.*, (2013), realizaron pruebas de exposición en lombrices *E. fetida* a diferentes tiempos (2, 7, 14 y 28 días) sobre suelos contaminados provenientes de tres zonas impactadas, con el objetivo de determinar el nivel de fragmentación al ADN que ocasiona la exposición a una mezcla de contaminantes, entre estos, Cu, Pb y Zn. Encontrando que en la zona 1 (con daño menor) el OTM es cercano a 2 con concentraciones de 58 ± 4.5 de Cu, 57 ± 5.6 de Pb y 238 ± 23 de Zn, mientras que en la mayoría de los cuatro sitios de referencia se encuentran sus concentraciones de estos elementos por debajo a los valores que aquí reportan, sin embargo, se obtuvo OTM entre 3.56 a 6.65. En la zona 3 (con daño mayor) el OTM es cercano a 13 con concentraciones de 466 ± 20.3 de Cu, 394 ± 8.4 de Pb y $1\ 729 \pm 51$ de Zn, mientras que en la mayoría de los sitios problema se registraron concentraciones por encima a estos valores, no obstante, el valor de OTM se encuentra por debajo a lo reportado por Zheng *et al.*, con valores entre 5.66 a 9.90 de OTM, por lo tanto, los sitios de referencia se encuentran con efecto muy próximo a la zona 1, y los sitios problemas muestran semejanza a valores mayores como en la zona 3 del presente caso de estudio. Por último, en Zheng *et al.*, mencionan que el daño al ADN disminuye parcialmente al aumentar el tiempo de exposición, resultando que el día 14 presenta menor efecto en esta prueba con un máximo de duración de 28 días.

Los bioensayos que se realizan con suelos artificiales y se les adiciona alguna concentración de elemento o mezcla de elementos, por lo general provienen de productos estándares diseñados especialmente para su fácil manejo y obtención de resultados, a diferencia de las muestras provenientes de sitios de estudio. A esto podría deberse el hecho que los anteriores autores adicionaron concentraciones inferiores de metales a las que encontramos en los sitios de estudio, y además encontrarán mayores valores de daño al ADN, aunado a esto, se debe considerar la adición de materia orgánica en los bioensayos. Al comparar entre sitios de estudio se debe considerar que cada sitio de estudio es diferente, no obstante, se registran resultados semejantes. Varios metales se han relacionado con el daño al ADN en lombriz dado que generan radicales libres mediante el estrés oxidativo (Calisi *et al.* 2011), para determinar este daño se utiliza el fluido celómico de la lombriz que se



conforma por celomocitos (contienen material genético), que a su vez contienen gránulos con diferencias morfológicas, agrupados como eleocitos y leucocitos, ambos son de carácter nutritivo por contener lípidos, proteínas y glucógeno; además, los eleocitos puede estar contribuyendo en la regeneración de órganos, mientras que los leucocitos eliminan células muertas, producto de la degradación y sustancias exógenas al organismo (Liebmann, 1942). Los metales pesados pueden inhibir algunas funciones inmunológicas en la lombriz, por ejemplo, pueden afectar la pinocitosis la cual es la capacidad de la membrana celular de absorber nutrientes por medio de la formación de vesículas pinocíticas (Homa *et al.* 2003), como lo menciona Fugère *et al.* (1996) y Burch *et al.* (1999) al señalar que se inhibe la actividad de fagocitosis en los celomocitos expuestos a metales pesados. También, se ha estudiado que algunos metales pueden aumentar la expresión de la hemoglobina en la lombriz, sin embargo no se han profundizado sobre ello y sus efectos (Calisi *et al.* 2011). Por otra parte, no se encontró algún estudio que demuestre una correlación entre el daño al ADN por exposición al Pb en lombriz de tierra, sin embargo, la EPA (2013) menciona que existen algunas evidencias asociadas a esta exposición en lombriz. En el presente estudio se determinó estadísticamente que dentro de los metales a los que se les asocia con el daño al ADN se incluye el Pb, por lo tanto, podríamos estar corroborando el potencial genotóxico del Pb en lombriz, por lo pronto esta es una aseveración que requiere de algún estudio específico. Por lo anterior, la exposición de la lombriz a metales pesados puede ocasionar efectos adversos en las funciones de los celomocitos, así como afectar su sistema inmune dejando vulnerable a la lombriz.

4.5 CONCLUSIÓN

Con el biomarcador de exposición realizado por Anaya (en proceso), el cual deriva de las lombrices resultantes de la prueba de toxicidad del presente estudio, se concluye que el As, Cd, Cu, Pb y Zn se encontraron biodisponibles y bioaccesibles en las lombrices expuestas a algunas muestras ambientales de los sitios de estudio

En general las lombrices expuestas a los suelos de referencia y a los residuos de los cuatro sitios presentaron mayor daño al ADN en comparación con el control negativo, mientras que en todos los sitios los residuos sólidos de mina generaron mayor efecto sobre el ADN en comparación con los suelos de referencia. Se determinó que existe diferencia estadísticamente significativa entre el sitio de referencia y el sitio problema de Cedral y Charcas, mientras que en Cerro de San Pedro y Villa de la Paz no existe diferencia significativa entre ambos tipos de muestras; sin embargo, se debe considerar la tendencia de los efectos generados. Nuestros resultados confirman que estos residuos sólidos de mina tienen mayor potencial genotóxico y potencialmente podrían representar un riesgo para otros componentes bióticos del ecosistema terrestre de los sitios evaluados. Los resultados obtenidos son congruentes y consistentes con lo reportado por varios autores, a excepción de las concentraciones de metales en nuestros sitios de estudio que se encuentran muy por encima en comparación con los artículos discutidos, esto puede deberse a la diferencia de preparación de los bioensayos, dado que los realizados de forma artificial (preparación de suelo y adición de concentraciones conocidas) no tienen las condiciones reales que aporta un sitio de estudio, esta diferencia se va haciendo más notoria con el ligero aumento de concentración y la adición de otro compuesto de naturaleza diferente a los metales. La prueba de asociación nos mostró que el pH, la CE y la concentración de metales y As están asociados a la genotoxicidad medida y cualquier cambio en ellos modificará la respuesta genotóxica, mientras que la prueba de componentes principales determinó que el As, Cd, Cu, Pb y Zn están asociados estadísticamente al efecto genotóxico medido con un 77.25%, incluyendo al Pb, cuyo metal no cuanta



con la suficiente evidencia científica del efecto genotóxico del Pb en lombriz, por lo que éste aporte es relevante. Con base a los resultados obtenidos, se conoce el potencial tóxico de los residuos sólidos de mina para las lombrices, a partir del efecto genotóxico en células individuales.

Cualquier nivel de efecto genotóxico que se genera, tiene un impacto directo con las funciones biológicas de los organismos expuestos, como en las lombrices que al ser expuestas a metales pueden perder o disminuir su capacidad de excretar sustancias exógenas de su organismo, de absorber nutrimentos a partir de la membrana celular, así como afectar su sistema inmune; pese a que las lombrices de tierra no predominen en estos sitios semi-desérticos, son importantes receptores ambientales y su vulnerabilidad propiciada por la exposición a metales las identifica como excelentes monitoras del ambiente. Por lo tanto, estos residuos mineros han demostrado tener el potencial de ocasionar estrés a nivel genético en las lombrices expuestas y aclimatadas a condiciones de laboratorio. Estos residuos de mina, igualmente pudieran provocar efectos similares en la fauna edáfica e invertebrados silvestres, como son los microorganismos e insectos, así como a las enzimas del suelo. Con esta exposición a residuos, se podría estar afectando funciones básicas como por ejemplo, del desarrollo, reproducción, crecimiento y comportamiento, disminuyendo así las poblaciones y comunidades de los organismos expuestos, expresándose en efectos a nivel de ecosistema, como falta en la degradación de materia orgánica para fijar nutrimentos que favorecen a otras especies, así como a la cobertura vegetal requerida para favorecer un ecosistema equilibrado, entre otros efectos a nivel ecosistémico. Los sitios de estudio (sitios problema) se encuentran siendo impactados por la industria minera, por la fragmentación ecológica, por esta razón, en sus alrededores próximos no es frecuente hallar abundancia biótica, sin embargo, dado que los residuos se encuentran depositados a la intemperie, las otras partes del ecosistema fragmentado pueden estar recibiendo este material con potencial genotóxico, por ello fue necesario realizar el presente estudio, para conocer este potencial desde su fuente de dispersión, y poder extrapolar el efecto que podrían estar causando a los seres vivos circundantes.

4.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anaya, G. L. (en proceso). *Evaluación de la exposición a metales en lombriz de tierra (*Eisenia andrei*) expuesta a residuos sólidos de sitios mineros de San Luis Potosí*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Arango, V.S.S. (2012). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Fac. Nac. Salud Pública*, 30(1), 75-82.
- Burch, S. W., Fitzpatrick, L. C., Goven, A. J., Venables, B. J., & Giggleman, M. A. (1999). In vitro earthworm *Lumbricus terrestris* coelomocyte assay for use in terrestrial identification evaluation. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 62, 547–554.
- Calisi, A., Lionetto, M. G., Sanchez-Hernandez, J. C., & Schettino, T. (2011). Effect of heavy metal exposure on blood haemoglobin concentration and methemoglobin percentage in *Lumbricus terrestris* *Ecotoxicology*, 20:847–854.
- Collins, A. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26, 249-261.
- Collins, A. R., Dobson, V. L., Dušinská, M., Kennedy, G., & Štětina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us?. *Mutation research*, 375, 183-193.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2013). *Final Report: Integrated Science Assessment for Lead*. U.S. Washington, DC.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., & Neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Reviews in Genetic Toxicology*. 339, p.37-59.
- Fugère, N., Brousseau, P., Krzystyniak, K., Coderre, D., & Fournier, M. (1996). Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity



- of heterogenous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology*, 109, 157–166.
- González-Mille, D. J., Espinoza-Reyes, G., Ilizaliturri-Hernández, C., Saavedra, J. J. M., Jasso-Pineda, Y., & Díaz-Barriga, F. (2012). *Ensayo cometa en fauna terrestre*. In M. d. C. C. Díaz, G. E. Reyes, C. A. I. Hernández, & A. M. Cantú (Eds.), *Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos*. Universidad de Veracruz: SEMARNAT-INE, 107-125
- Homa, J., Niklinska, M., & Plytycz, B. (2003). Effect of heavy metals on coelomocytes of the earthworm *Allolobophora chlorotica*. *Pedobiologia* 47, 640–645.
- Jiang, Z., Zuo-yuan, Z., & Yi-tong, L. (2006). Evaluation of genotoxicity of combined soil pollution by cadmium and phenanthrene on earthworm. *Journal of Environmental Sciences*, 18, 1210-1215.
- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., & Jha, A. N. (2009). Comet assay measurements: a prespective. *Cell Biol Toxicol*, 25, 53-64.
- Lee, R. F., & Steinert, S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544, 43-64.
- Liebmann, E. (1942). The coelomocytes of lumbricidae. *Journal of morfology*, 71(2), 221-249.
- Long, E. R. & MacDonald, D. D. (1998). Recomendated uses of empirically derived, sediment quality guidelines for marine and estuarine ecosystems. *Hum. Ecol. Risk Assess*, 4, 1019-1039.
- Lourenço, J., Pereira, R., Silva, A. C., Morgado, J. M., Oliveira, J., & Gonçalves, F. (2010). Measurement of genotoxic Endpoints in earthworms exposed to radioactive wastes from an abandoned uranium mine. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry*, 219–225.

- Otomo, P. V. (2006). *The effects of long-term exposure to cadmium on the earthworm Eisenia fetida (oligocheaeta): an investigation of development of geneti metal resistance*. Master thesis, University of Stellenbosch.
- Ramírez, P. R., & Mendoza, C. A. (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas del agua y suelo. *La experiencia en México*. INE-SEMARNAT, México, D. F., p.233-273.
- Repetto, J.M., & Repetto, K.G. (2009). *Toxicología fundamental*. Ed.Díaz de Santos, p.620.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A single technique for quantitation of low levels of ADN damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175, 184-191.
- Shugart, L. R. (2000). DNA damage as biomarker of exposure. *Ecotoxicology*, 9, 329-340.
- Speit, G., & Hartmann, A. (1999). *The comet assay (Single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for detection of ADN damage and repair*. *Methods in Molecular Biology*. 113, 203-212.
- StatSoft, Inc. (2010). *STATISTICA (data analysis software system)*. Version 8.0. www.statsoft.com.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35, 206-221.
- Wang, J.-H., Zhu, L.-S., Meng, Y., Wang, J., Xie, H., & Zhangyz, Q.-M. (2012). The combined stress effects of atrazine and cadmium on the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 2035-2040.



- Wu, B., Liu, Z., Xu, Y., Li, D., & Li, M. (2012). Combined toxicity of cadmium and lead on the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 81, 121-126.
- Yuquan, L. U., Takeshita, T., & Morimoto, K. (1997). Single-cell gel electrophoresis (SCG)-a review and discussion. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 2, 53-58.
- Zheng, K., Liu, Z. T., Li, Y. J., Cui, Y. B., & Li, M. (2013). Toxicological responses of earthworm (*Eisenia fetida*) exposed to metal-contaminated soils. *Environ Sci Pollut Res*, 20, 8382–8390.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES



1. Las concentraciones de As, Cd, Cu, Pb y Zn se encuentran con valores superiores en los residuos y en su mayoría, superan los valores de seguridad para invertebrados, pese a que algunos suelos de referencia tienen altas concentraciones de forma natural, las concentraciones en los residuos superan las concentraciones umbrales. El As se encontró en mayor concentración en el sitio problema de Villa de la Paz, mientras que el Cd, Cu, Pb y Zn en el sitio problema de Charcas.
2. La prueba de letalidad mostró la mayor letalidad en los residuos de Cerro de San Pedro seguido por Charcas, en el resto de los sitios no se obtuvo letalidad, esta escasa letalidad probablemente se debe a la dilución del residuo con 50% de materia orgánica.
3. Las lombrices expuestas a los residuos sólidos de mina perdieron mayor peso que las expuestas a los suelos de referencia.
4. La prueba de migración fue positiva, mostrando que las lombrices prefieren el sustrato control seguido por el suelo de referencia y evaden en su mayoría el residuo.
5. El biomarcador de exposición mostró que el As, Cd, Cu, Pb y Zn se encontraban en los tejidos de las lombrices en mayor concentración en las muestras de lombrices de los sitios problema.
6. La prueba de genotoxicidad expresó una tendencia decreciente en efecto en donde los residuos tienen mayor efecto seguido por los suelos de referencia y con menor daño la prueba control. El OTM y *Tail Length* de los sitios problemas resultó mayor en Charcas, seguido por valores cercanos en los sitios Cerro de San Pedro y Villa de la Paz, y por último en Cedral.
7. La prueba de asociación mostró que la CE, el pH, la mezcla de concentraciones de metales y As halladas en los sitios de estudio están relacionados con el aumento del efecto genotóxico en células individuales de lombriz medidas a través del OTM y TL.
8. El análisis de componentes principales determinó que el Cd, Cu, Pb y Zn está mayormente asociado (57.15%) al efecto genotóxico registrado.

9. Con los anteriores resultados se determinó que los residuos sólidos de mina de todos los sitios de estudio evaluados son potencialmente tóxico para la lombriz de tierra por lo tanto pueden considerarse efectos tóxicos y genotóxicos similares para otros organismos edáficos invertebrados con importancia ecológica, lo que podría reflejarse a mayor escala a nivel de ecosistema con la disminución de poblaciones y comunidades ecológicas afectadas de forma directa o indirecta, las cuales podrían estar desarrollando importantes funciones ecológicas en estos sitios de estudio, y de continuar siendo impactadas por estos residuos sólidos de mina, los efectos ambientales podrían resultar con la pérdida de la biodiversidad a largo plazo. Por esta razón, se considera que todos los sitios requieren medidas de intervención para disminuir las concentraciones hasta niveles de seguridad para cada EPT, dado que todos los sitios problema muestran efectos tóxicos mayores a los encontrados en los sitios de referencia. En el sitio problema de Charcas se registró mayor respuesta toxicológica seguida por los sitios Cerro de San Pedro y Villa de la Paz, y Cedral, todos los resultados aquí presentados son generados desde el punto de vista de animales invertebrados y edáficos, y complementa otros estudios de interés toxicológicos realizados por el equipo de investigación CIAAS (Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, que incluye otros niveles tróficos y medios ambientales.



RECOMENDACIONES

- Se sugiere utilizar muestras completas (no adicionadas con materia orgánica) para los bioensayos de letalidad dado que acondicionar las muestras provoca la pérdida de información.
- Para la prueba de genotoxicidad se recomienda diluir (realizar mezclas) con *peat moss* hasta alcanzar la CE_{50} para cada muestra recolectada, y de esta forma obtener el daño al ADN partiendo de una mezcla representativa.
- Cuantificar los metales en la excreta de lombriz para complementar el biomarcador de exposición en muestra de lombriz, además de aportar evidencia de medidas de biorremediación a partir del uso de la lombriz.

ANEXO FOTOGRÁFICO



Figura 56. Sitios de muestreo de Cedral: referencia y problema.



Figura 57. Cedral: sitio de referencia.



Figura 58. Cedral: sitio problema.



Figura 59. Sitios de muestreo de Cerro de San Pedro: referencia y problema.



Figura 60. Cerro de San Pedro: sitio de referencia.



Figura 61. Cerro de San Pedro: sitio problema.



Figura 62. Sitios de muestreo de Charcas: referencia y problema.



Figura 63. Charcas: sitio de referencia.



Figura 64. Charcas: sitio problema.

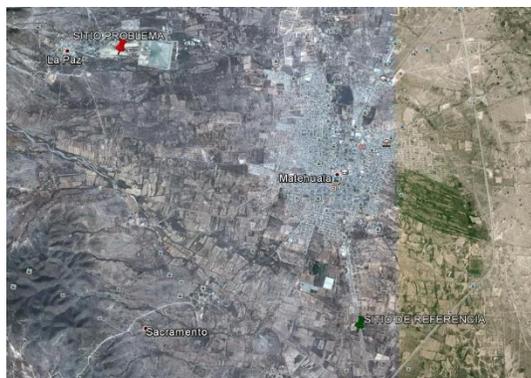


Figura 65. Sitios de muestreo de Villa de la Paz: referencia y problema.



Figura 66. Villa de la Paz: sitio de referencia.



Figura 67. Villa de la Paz: sitio problema.

GLOSARIO



- Anélido:** representa a un filo de animales invertebrados cilíndricos y segmentados.
- Bioaccesible:** cantidad de algún elemento o sustancia que puede absorberse por el epitelio de cualquier tejido biológico, para ingresar a las células y producir algún efecto sobre ellas.
- Biodisponible:** fracción propia de cada elemento o sustancia, la cual tiene la capacidad de ingresar a un receptor biológico.
- Bioensayo:** pruebas toxicológicas controladas para evaluar la respuesta biológica de un organismo expuesto a cualquier agente químico o físico, permitiendo medir cualitativamente o cuantitativamente el potencial tóxico.
- Biomarcador:** son una respuesta biológica dentro de un sistema biológico y permiten evaluar experimentalmente su exposición a agentes contaminantes, reflejando cuantitativamente esta interacción a nivel individuo o población, para así, conocer los posibles efectos toxicológicos presentes en el ecosistema.
- Cualitativo:** relativo a cualidad.
- Cuantitativo:** relativo a cantidad.
- Distrito minero:** zona geográfica con la misma metalogenética.
- Dore:** mezcla impura y sin refinar de oro metálico y plata.
- Ecosistema:** comunidad de los seres vivos cuyos procesos vitales se relacionan entre sí y se desarrollan en función de los factores físicos de un mismo ambiente.
- Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT):** se caracterizan por su biodisponibilidad y su capacidad de Bioacumulación que puede generar riesgo a la salud y al ambiente.
- Escoria:** subproducto de la fundición de mena.
- Factor estresante:** cualquier sustancia o elemento que se encuentre en concentraciones superiores a las naturales o que sea ajeno al ambiente (no esencial).
- Exposición aguda:** exposición a alguna sustancia química por 14 días o menos.
- Ganga:** minerales sin valor económico que son depositados en los terreros.
- Genotóxico:** sustancia que puede tener algún efecto sobre el ADN.
- Granate:** piedra fina compuesta de silicato doble de alúmina y de hierro u otros óxidos metálicos.
- Granítico:** relativo al granito.
- Granodiorítico:** litología de textura granular.
- Horizonte A:** capa superficial del suelo que contiene raíces, microorganismos y materia orgánica en proceso de descomposición.
- Intemperismo:** acción combinada de procesos que descomponen y desintegran a las rocas por su exposición constante a las condiciones ambientales.
- Jales:** residuo sólido de mina que se genera a terminar de lixiviar los elementos minerales de interés económico, se caracteriza por contener elementos tóxicos y una granulometría fina.
- Ley mineral:** medida para describir el grado de concentración de minerales de interés.
- Línea de evidencia:** variables cuantitativas y cualitativas presentadas individualmente que aportan información necesaria para tomar decisiones al unirse.

Lixiviación: extracción de la materia soluble de una mezcla mediante la acción de un disolvente líquido.

Mena: roca de composición mineralógica uniforme que forma parte de la reserva económica de un yacimiento.

Metalogenética: es un área caracterizada por una agrupación de depósitos minerales o por uno o más tipos característicos de depósitos.

Metamorfismo de contacto: es un conjunto de alteraciones mineralógicas y estructurales inducidos en las rocas por la cercanía o contacto con cuerpos intrusivos de rocas ígneas, produciéndose un aumento en el grado de metamorfismo a medida que se aproxima al contacto.

Metasomático: introducción de material procedente de una fuente externa.

Mina de tajo: o a cielo abierto.

Nivel de fondo: o concentración de fondo, es la concentración natural de sustancias o agentes presentes en el medioambiente, sin influencia del ser humano.

Patio de beneficio: procedimiento minero utilizado para separar la plata y el oro de otros metales, mediante el uso de mercurio y sales.

Peligro: riesgo o contingencia inminente de que suceda algún mal.

Planta de beneficio: sitio para dar tratamiento a los minerales.

Piroxeno: mineral silíceo que aparece en rocas metamórficas ricas en magnesio y en hierro.

Potencial tóxico: se caracteriza por la magnitud de efectos negativos sobre los componentes de los ecosistemas, que se pueden generar de forma individual o sinérgica por elemento(s) o compuesto(s) exógeno(s) o esencial(es) en concentraciones significativas. Este potencial se estima a partir de datos cuantitativos y cualitativos.

Región minera: territorio con la misma formación mineral.

Residuo: material que es desechado.

Salud ambiental: está relacionada con todos los factores físicos, químicos y biológicos externos de una persona. Es decir, que engloba factores ambientales que podrían incidir en la salud y se basa en la prevención de las enfermedades y en la creación de ambientes propicios para la salud. Por consiguiente, queda excluido de esta definición cualquier comportamiento no relacionado con el medio ambiente, así como cualquier comportamiento relacionado con el entorno social y económico y con la genética.

Sistema biológico: es una red compleja de entidades biológicas relevantes. Por lo general se usa para referirse a sistema de órganos y tejidos, tales como el sistema circulatorio, el sistema digestivo o el sistema nervioso.

Sitio problema: lugar que por sus características naturales o antropogénicas, se plantea sobre ella una situación para obtener respuestas a través de métodos científicos.

Suelo: superficie terrestre que cumple con conformarse de varias capas u horizontes.

Suelo de referencia: Muestra ambientales conformadas por suelos sin algún impacto significativo y que se encuentra dentro de la zona geológica del sitio contaminado.



Terreros: material residual de la actividad de minería en sus etapas de minado y beneficio, se caracteriza por ser un material inerte y partícula granular gruesa, aunque actualmente las características de este se asemejan a los jales.

Tóxico: contiene veneno o produce envenenamiento.

Xenobiotico: compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el ser humano en el laboratorio.

Yacimiento: sitio donde se halla naturalmente una roca, un mineral o un fósil.

Zona mineralizada: territorios delimitados por el contenido de minerales.

"Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber"

Albert Einstein