



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIODIVERSIDAD Y  
CONSERVACIÓN**

**ANÁLISIS ECOTOXICOLÓGICO DE COMUNIDADES  
DE ANUROS QUE HABITAN EN ÁREAS CERCANAS  
A UN JAL MINERO EN SIERRA DE HUAUTLA**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN BIOLOGÍA INTEGRATIVA DE  
LA BIODIVERSIDAD Y LA CONSERVACIÓN

**PRESENTA:**

**Biól. Eduardo Aarón Chávez Ramírez**

DIRECTOR: DR. NORMAN MERCADO SILVA  
CO-DIRECTOR: DRA. PATRICIA MUSSALI GALANTE



**Cuernavaca, Morelos**

**Mayo, 2020**



## Índice de contenido

|  |     |
|--|-----|
| Índice de figuras.....   | I   |
| Índice de cuadros.....   | I   |
| Índice de ecuaciones .....   | II  |
| Resumen.....   | III |
| Abstract.....  | IV  |
| Introducción .....   | 1   |
| Minería como fuente de contaminación ambiental .....                                     | 1   |
| Jales mineros .....  | 3   |
| Metales pesados .....  | 4   |
| Bioacumulación de metales pesados .....  | 4   |
| Mecanismos de toxicidad de los metales pesados.....                                      | 6   |
| Efectos de los metales pesados a nivel individual: fisiología de los organismos.....     | 6   |
| Efecto de los metales pesados sobre la morfología de los organismos .....                | 7   |
| Efecto de los metales pesados a nivel poblacional.....                                   | 7   |
| Efecto de la bioacumulación de metales pesados a nivel comunidad .....                   | 8   |
| Anfibios como bioindicadores de contaminación ambiental.....                             | 8   |
| Antecedentes .....   | 10  |
| Bioacumulación de metales pesados en anuros.....   | 10  |
| Efectos de la bioacumulación de metales pesados sobre la morfología de anuros.....       | 11  |
| Efectos de la bioacumulación de metales pesados sobre la estructura de comunidades ..... | 12  |
| Justificación.....   | 16  |
| Objetivo General .....   | 16  |
| Objetivos particulares.....  | 16  |
| Hipótesis.....   | 16  |
| Metodología .....  | 17  |
| Descripción de los sitios de muestreo .....  | 17  |
| Muestreo de agua y sedimento .....   | 20  |
| Medición de sólidos suspendidos volátiles (SSV) .....                                    | 20  |
| Criterios de selección de anuros para análisis de metales pesados .....                  | 20  |
| Contención y sacrificio de anuros .....  | 21  |
| Índice multi-metal de concentración (IMC) y bioacumulación relativa (IMBI) .....         | 22  |
| Muestreo de anuros .....   | 22  |
| Composición y Diversidad.....  | 23  |
| Análisis estadísticos .....  | 25  |
| Resultados .....   | 26  |
| Metales pesados contenidos en los cuerpos de agua de cada sitio de estudio .....         | 26  |
| Metales pesados asociados al sedimento en cada uno de los sitios de estudio.....         | 26  |
| Sólidos volátiles suspendidos en sedimento (SVS).....                                    | 27  |
| Índice multi-metal de concentración en agua y sedimento (IMC) .....                      | 28  |
| Bioacumulación de metales pesados en el hígado de <i>Smilisca baudinii</i> .....         | 29  |
| Bioacumulación de metales en el hígado de <i>Lithobates zweifeli</i> .....               | 30  |
| Bioacumulación de metales pesados en <i>Lithobates spectabilis</i> .....                 | 32  |
| Bioacumulación de metales en <i>Rhinella horribilis</i> .....                            | 33  |
| Muestreo de anuros .....   | 34  |
| Riqueza de anuros .....  | 35  |
| Estimación de la riqueza de especies .....   | 35  |
| Estimación de la riqueza por sitio .....   | 36  |
| Abundancia de anuros en los sitios de muestreo del gradiente de contaminación .....      | 37  |
| Diversidad, equidad y dominancia .....   | 39  |

|  |    |
|--|----|
| Índice de similitud de Jaccard y Sorensen.....   | 40 |
| Composición de especies de anuros por sitio de muestreo en el gradiente de contaminación del río Huautla.....  | 41 |
| Efectos de la bioacumulación de metales pesados sobre los valores de diversidad de anuros en los sitios del gradiente de contaminación del río Huautla ..... | 43 |
| Discusión .....  | 44 |
| Concentración de metales pesados en agua y sedimento .....   | 44 |
| Bioacumulación de metales en hígado de anuros.....   | 47 |
| Estructura de la comunidad de anuros.....  | 55 |
| Aspectos generales .....   | 55 |
| Diversidad de especies de anuros en los sitios del gradiente de contaminación por metales pesados del río Huautla. ....                                      | 55 |
| Conclusiones .....   | 57 |
| Perspectivas.....  | 58 |
| Referencias.....   | 59 |
| Anexo fotográfico .....  | 75 |

---

## Índice de figuras

---

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Diagrama de las rutas de exposición de anfibios..   | 10 |
| Figura 2. Mapa de la zona de estudio con la localización de los sitios de muestreo.....   | 18 |
| Figura 3. Sitios de muestreo. Se muestra la estructura física de los sitios de estudio..  | 19 |
| Figura 4. Índice de concentración multi-metal IMC en: A) agua y B) sedimentos.....  | 28 |
| Figura 5. Correlación el índice multimetal de concentración (IMC) de agua y sedimentos.   | 29 |
| Figura 6. Índice de bioacumulación relativa de <i>S. baudinii</i> ..  | 30 |
| Figura 7. Correlación de Spearman para los valores de IMBI en <i>L. zweifeli</i> y los valores IMC en las matrices ambientales A) agua y B) sedimento.....              | 31 |
| Figura 8. Índice de bioacumulación relativa en <i>L. zweifeli</i> . Se muestra la mezcla de metales por sitio y la proporción de cada metal dentro de la muestra.....   | 31 |
| Figura 9. Índice de bioacumulación relativa de <i>L. spectabilis</i> ..   | 32 |
| Figura 10. Índice de bioacumulación relativa de <i>R. horribilis</i> .....  | 33 |
| Figura 11. Riqueza total por sitio de muestreo dentro de cuenca del río Huautla.....  | 35 |
| Figura 12. Curvas de acumulación de especies de anuros para el ejido Huautla..  | 36 |
| Figura 13. Curvas de acumulación de especies por sitio de muestreo..  | 37 |
| Figura 14. Abundancia de las especies de anuros para la cuenca del río Huautla.....   | 38 |
| Figura 15. Abundancia relativa de las especies de anuros por sitio de muestreo.....   | 38 |
| Figura 16. Índices de diversidad de Shannon-Wiener, Simpson, Pielou y dominancia. ....  | 40 |
| Figura 17. Curvas rango-abundancia de las especies de anuros por sitio dentro del gradiente de contaminación del río Huautla.....                                       | 42 |
| Figura 18. Tendencia a lo largo del gradiente de contaminación de los valores de diversidad de Shannon-Wiener y Simpson en relación con los valores IMBI por sitio..... | 43 |

---

## Índice de cuadros

---

|  |    |
|--|----|
| Cuadro 1. Etapas de las actividades mineras y su relación con los impactos al ambiente. ....   | 2  |
| Cuadro 2. Antecedentes de estudios ecotoxicológicos con anuros en ambientes contaminados con metales pesados. ....   | 14 |
| Cuadro 3. Antecedentes de estudios ecotoxicológicos en el ejido Huautla.....   | 15 |
| Cuadro 4. Número de individuos por especie para el análisis de metales pesados. ....   | 21 |
| Cuadro 5. Concentraciones de metales pesados en agua y sedimentos.....   | 27 |
| Cuadro 6. Promedio y desviación estándar para Plomo, Zinc, Manganeso, Hierro, Cadmio y Cobre bioacumulados en el hígado de <i>Smilisca baudinii</i> .....    | 29 |
| Cuadro 7. Promedio y desviación estándar de Plomo, Zinc, Manganeso, Hierro, Cadmio y Cobre bioacumulados en el hígado de <i>Lithobates zweifeli</i> .....    | 30 |
| Cuadro 8. Promedio y desviación estándar de Plomo, Zinc, Manganeso, Hierro, Cadmio y Cobre bioacumulados en el hígado de <i>Lithobates spectabilis</i> ..... | 32 |
| Cuadro 9. Promedio y desviación estándar de Plomo, Zinc, Manganeso, Hierro, Cadmio y Cobre bioacumulados en el hígado de <i>Lithobates spectabilis</i> ..... | 33 |
| Cuadro 10. Especies de anuros en los sitios de muestreo del río Huautla.....   | 34 |
| Cuadro 11. Riqueza observada y estimada por cada estimador empleado para la comunidad de anfibios del río Huautla.....                                       | 35 |
| Cuadro 12. Riqueza observada y estimada por sitio de muestreo..  | 36 |
| Cuadro 13. Prueba Delta de Solow aplicada al índice de Shannon-Wiener y Simpson.....   | 39 |
| Cuadro 14. Índice de similitud de Sorensen y Jaccard. ....   | 40 |

---

## **Índice de ecuaciones**

---

|   |    |
|---|----|
| Ecuación 1 ) Sólidos volátiles (SSV) .....    | 20 |
| Ecuación 2 ) Índice multimetal IMC-IMBI.....  | 22 |
| Ecuación 3 ) Abundancia relativa.....         | 23 |
| Ecuación 4 ) Índice de Shannon-Wiener .....   | 23 |
| Ecuación 5 ) Índice de Simpson .....          | 24 |
| Ecuación 6 ) Índice de Equidad de Pielou..... | 24 |
| Ecuación 7 ) Índice de Jaccard .....          | 24 |
| Ecuación 8 ) Índice de Sorensen.....          | 24 |

---

## Resumen

El ejido Huautla, en Tlaquiltenango, Morelos, México es un distrito minero inactivo en el que se ha cuantificado un estimado de 780 mil toneladas de jales. Estos contienen metales pesados (MP). Los cuales tienen efectos negativos en todos los niveles de organización biológica. Los efectos de los MP sobre las comunidades biológicas se reflejan en cambios en su composición, dominancia, riqueza y diversidad. Se ha estudiado la relación de los MP con distintos componentes biológicos en Sierra de Huautla, sin embargo, no se han analizado las comunidades de anuros. El objetivo de este estudio fue cuantificar la concentración de MP (Zn, Fe, Cr, Cd, Cu, Pb, Mn) en el agua y sedimentos del Río Huautla y sus efectos potenciales sobre la comunidad de anuros. El rango de concentración promedio (mg/L) en agua para Pb osciló de 2.628 a 5.079 mg/L; para Cd fue de 0.093 a 0.108 mg/L; para Cu fue de 1.262 a 1.716 mg/L; para Mn fue de 0.000 a 0.424 mg/L y las de Zn fueron de 0.038 a 0.159 mg/L. No se detectaron concentraciones de Fe y Cr. Las concentraciones de Pb estuvieron por encima de lo establecido en la NOM-001-SEMARNAT-1996, el Cd, Cu, Mn y Zn estuvieron en concentraciones dentro del límite en todos los sitios. En sedimento, el rango de concentración promedio de Fe fue de 126.473 a 234.188 mg/L; para Cr fue de 1.966 a 1.002 mg/L; para Mn fue de 0.479 a 1.617 mg/L; para Zn fue de 1.737 a 5.979 mg/L; para Cu fue de 0.061 a 0.375 mg/L. No se detectaron concentraciones promedio de Cu para los S2 y S3. El Pb y Cd no fueron detectados en sedimentos. El IMC demuestra la presencia de un gradiente de contaminación por MP en agua y sedimentos (S1>S2>S3>S4>S5). Se registró bioacumulación de Pb, Zn, Cu, Mn, Fe y Cd en el hígado de las cuatro especies de anuros en la zona de estudio. La bioacumulación promedio Pb fue de 2.045 a 0.081 mg/Kg, (S4>S3>S2>S5>S1); para Fe fue de 29.216 a 9.707 mg/Kg (S5>S1>S3>S2>S4); para Cu fue de 0.433 a 0.035 mg/Kg (S5>S4>S1>S2>S3); para Zn fue de 4.856 a 0.432 mg/Kg (S5>S4>S1>S2>S3); para Mn fue de 0.239 a 0.15 mg/Kg (S2>S3>S4>S5>S1). En total se registraron nueve especies de anuros contenidas en ocho géneros y cinco familias durante la temporada de lluvias de 2018 y 2019. Se observó un patrón de incremento de los valores de diversidad de Shannon (S4>S5>S2>S2>S1) y Simpson (S1>S2>S3>S4>S5) conforme la cercanía al jal. La dominancia presentó un patrón de incremento conforme los sitios se encontraron más alejados del jal. El patrón observado para los valores de equidad (S5>S4>S3>S2>S1) indica que la equidad fue mayor en el jal y sitio corriente abajo del jal. Este trabajo provee de información con alto valor científico ya que es el primer estudio que analiza la concentración de MP bioacumulados en el hígado de anuros y sus efectos potenciales sobre la estructura de la comunidad, además demuestra la presencia de un gradiente de contaminación en la mezcla de MP concentrados en el agua y sedimentos del río Huautla.

Palabras clave: Jales, Metales, Comunidades, Anuros, Composición.

## Abstract

The Huautla region, in Tlaquiltenango, Morelos, Mexico has an estimated 780 thousand tons of mine tailings from now suspended mining activity. These contain heavy metals which can have negative effects on the composition, dominance, richness and diversity of biological communities. The effects of heavy metals have been studied for several biological groups, but anurans had not been analyzed. We report on heavy metal concentrations (Zn, Fe, Cr, Cd, Pb) in water from the Huautla river, and discuss their potential effects on the anuran community. The average concentration range (mg / L) in water for Pb ranged from 2,628 to 5,079 mg / L; for Cd it was from 0.093 to 0.108 mg / L; for Cu it was from 1,262 to 1,716 mg / L; for Mn it was from 0.000 to 0.424 mg / L and the Zn were from 0.038 to 0.159 mg / L. The variations in Fe and Cr were not detected. The Pb figures were above that established in NOM-001-SEMARNAT- 1996, Cd, Cu, Mn, and Zn accounted for within the boundary at all sites. In sediment, the average concentration range of Fe was from 126,473 to 234,188 mg / L; for Cr it was from 1,966 to 1,002 mg / L; for Mn it was from 0.479 to 1.617 mg / L; for Zn it was from 1,737 to 5,979 mg / L; for Cu it was from 0.061 to 0.375 mg / L. No average variations of Cu were detected for S2 and S3. Pb and Cd were not detected in sediments. IMC demonstrates the presence of a heavy metals contamination gradient in water and sediments (S1> S2> S3> S4> S5). This is bioaccumulation of Pb, Zn, Cu, Mn, Fe and Cd in the liver of the four species of anurans in the study area. The average bioaccumulation Pb was 2,045 to 0.081 mg / Kg, (S4> S3> S2> S5> S1); for Fe it was from 29,216 to 9,707 mg / Kg (S5> S1> S3> S2> S4); for Cu it was from 0.433 to 0.035 mg / Kg (S5> S4> S1> S2> S3); for Zn it was from 4,856 to 0.432 mg / Kg (S5> S4> S1> S2> S3); for Mn it was from 0.239 to 0.15 mg / Kg (S2> S3> S4> S5> S1). In total, nine species of anurans contained in eight genera and five families were recorded during the rainy season of 2018 and 2019. There was a pattern of increase in the diversity values of Shannon (S4> S5> S2> S2> S1) and Simpson (S1> S2> S3> S4> S5) according to the proximity to the jal. Dominance presented a pattern of increase as sites were further away from the jal. The observed pattern for equity values (S5> S4> S3> S2> S1) indicates that equity was greater at the tail end and downstream point of the tail. This work provides information with high scientific value since it is the first study that analyzes the concentration of bioaccumulated MP in the liver of anurans and its potential effects on the structure of the community, also demonstrates the presence of a contamination gradient of the mixture. of heavy metals concentrated in the water and sediments of the Huautla River.

Key words: Tailings, metals, Communities, Anurans, Composition

## Introducción

### *Minería como fuente de contaminación ambiental*

En el mundo, la minería es una de las actividades con mayor demanda, y ha sido considerada como una actividad de primer orden para la red productiva industrial, ya que es indispensable para la creación de tecnologías. La mayoría de los componentes de los equipos modernos están fabricados con metales como el Hierro (Fe), Cobre (Cu), Cadmio (Cd), Plomo (Pb) y otros elementos como el Silicio (Si) (Gocht et al., 1988; Carrere, 2004). La minería se encarga de la búsqueda, extracción y procesamiento de elementos metálicos y no metálicos que se encuentran en la corteza terrestre, de forma que sean rentables económicamente (Parejo y Parejo, 2012). En el mundo México ocupa el 4<sup>to</sup> lugar para la inversión y exploración minera y el 1<sup>ero</sup> en América Latina (SNL Metales y Minería, 2016).

En México la minería y las actividades minero-metalúrgicas tienen una larga historia en el desarrollo económico y sociocultural, en donde actualmente en las 32 entidades federativas de la República Mexicana existen distritos mineros, de los cuales sólo 24 se encuentran activos (Ramos-Arroyo et al., 2004; González-Brito, 2005). En materia económica el sector minero metalúrgico contribuye con el 4% del producto interno bruto nacional y se encuentra dentro de los 10 principales productores de Plata (Ag), Plomo (Pb), Zinc (Zn), Molibdeno (Mo), Oro (Au) y Cobre (Cu) (Inegi, 2014; SE, 2020). Por todo lo anterior la minería, como actividad económica, es de suma importancia en México y existen concesiones para actividades relacionadas a minería en todas las entidades del País (INEGI, 2016a). Sin embargo, esta actividad económica es causa importante de contaminación y deterioro ambiental en todos sus procesos (Volke et al., 2004; Cuadro 1) debido al volumen de residuos que se generan (DOF, 2011). Se estima que la minería ha generado alrededor del 65% de los residuos industriales existentes (Carrizales et al., 2005). En operaciones a cielo abierto es común que se alcancen volúmenes de residuos mineros 10 veces mayores por unidad de mineral procesado (DOF, 2011). Como resultado de la actividad minera se han generado innumerables sitios contaminados en México (Carrizales et al., 2005).

En Morelos un buen ejemplo de sitio contaminado es el ejido Huautla (Volke et al., 2004). En el ejido Huautla, en el municipio de Tlaquiltenango, por varias décadas, se explotó principalmente Ag, Pb y Zn (Volke et al., 2004). Las actividades mineras han cesado pero se estima que ahí existen actualmente un total de 780 mil toneladas de residuos sin procesamiento (SEMARNAT, 2000). Los residuos generados, llamados jales son una fuente importante de contaminación, los cuales tienen efectos negativos en subsuelo, atmósfera y la biota (Puga et al., 2006). De esta forma la actividad minera y sus residuos acarrearán consigo procesos destructivos que alteran las condiciones abióticas y bióticas en todos los niveles de organización, desde el nivel molecular hasta nivel ecosistema (Mussali-Galante et al., 2013; Sonter et al., 2018).

**Cuadro 1.** Etapas de las actividades mineras y su relación con los impactos al ambiente.

| ETAPA                          | DESCRIPCIÓN   | IMPACTOS AL AMBIENTE   |
|--------------------------------|---|--|
| <b>Prospección</b>             | Estudios de gravimetría, geología superficial, densidad, entre otros.   | Procedimientos que no generan impactos ambientales significativos.   |
| <b>Exploración</b>             | Barrenación, obras y perforaciones, construcción de caminos, instalación de campamentos.  | Destrucción de la vegetación.  |
| <b>Explotación y beneficio</b> | <p>Descapote: eliminación desuelo y vegetación.</p> <p>Construcción y obras diversas (tiros, socavones, patios de depósito).</p> <p>Alto consumo de agua.</p> <p>Acumulación de material sin valor en terrenos.</p> <p>Transporte del material con valor hacia molinos.</p> <p>Extracción y concentración de minerales.</p> <p>Reducción del tamaño mineral por trituración y molienda.</p> <p>Tratamientos previos a una fusión primaria o electro-depositación.</p> | <p>Destrucción de la capa de suelo y la vegetación.</p> <p>Afectación a cuerpos de agua.</p> <p>Generación de terrenos inestables.</p> <p>Generación de jales o colas<sup>1</sup>: residuos minerales sin valor.</p> <p>Escurrimientos y arrastres de residuos.</p> <p>Oxidación de minerales insolubles y formación de sustancias solubles con alto contenido de metales (drenaje ácido).</p> <p>Descarga de lixiviados que contienen iones metálicos y reactivos tóxicos.</p> <p>La trituración y molienda provocan ruido, vibración y emisión de polvo (efectos de bajo impacto).</p> |
| <b>Fundición y refinación</b>  | <p>Obtención de metales y sus aleaciones con el uso de hornos industriales.</p> <p>Eliminación de impurezas en los metales para alcanzar una alta ley de contenido.</p>   | Generación de aguas residuales, residuos peligrosos, emisiones a la atmósfera.   |

<sup>1</sup>Residuos de los procesos de flotación que, generalmente, contienen metales en formas insolubles, sales básicas o ácidas y vestigios solubles de elementos derivados de la oxidación de jales, como Arsénico (As) y Selenio (Se), entre otros.

Fuente: Gutiérrez y Moreno, 1997; Gutiérrez, 2003

***Jales mineros***

Los jales (relaves, colas o *tailings*) son residuos altamente persistentes en el ambiente (Delfín-Alcalá, 2008). Presentan una granulometría fina ( $\leq 50\mu\text{m}$ ) y son el resultado de la recuperación de metales, posterior a la molienda de rocas ricas en minerales con mezclas de partículas que se forman con agua y pequeñas cantidades de reactivos químicos para la liberación de los minerales de interés (Méndez-Ramírez y Armienta, 2012). Los jales son depositados en la cercanía a la mina generalmente sin ningún tipo de tratamiento (Gutiérrez-Ruiz et al., 2007). La mayoría se encuentra como una mezcla líquida, que de cierta forma se comporta como suelo, sin embargo, las diferencias entre los suelos y los jales radican en que el suelo es un cuerpo natural, no consolidado, formado por sólidos (materiales minerales y orgánicos), líquidos y gases, dentro del cual se forman capas diferenciales llamadas horizontes, que son el resultado de las adiciones, pérdidas, transformaciones y transferencias de energía y materia a lo largo del tiempo, y donde el espesor puede abarcar desde la superficie terrestre hasta varios metros de profundidad (Spisto, 1989; Velasco et al., 2005), contrario a los jales que inicialmente son bajos pero aumentan su tamaño con el tiempo (Salas-Megchún, 2014).

Los jales se encuentran en la mayoría de los casos expuestos a la atmósfera, cubiertos por agua y/o vegetación (Lottermoser, 2010; Solís, 2016). La mayoría sin obras para el desvío de aguas de escurrimiento hacia las cuencas, lo que incrementa el riesgo por erosión hídrica, provocando importantes daños en los diferentes compartimentos del ambiente (Volke et al., 2004). Los jales al estar expuestos por períodos prolongados a la lluvia, incrementan el tamaño de poro y la capacidad de saturación alcanza el 100% y pueden fluir por acción de su peso en forma líquida. El resultado de la saturación es la disminución de estabilidad y el deslizamiento del jal (Ramos-Arroyo y Siebe-Grabach, 2006), que dependiendo la mineralogía pueden provocar drenaje ácido.

Los efectos sobre los ecosistemas y la salud por parte del drenaje ácido, dependen en gran medida del tipo de explotación, el proceso de beneficio, la escala de las operaciones, las características del entorno y la composición que presenten los jales, la cual varía de acuerdo con la mineralogía del yacimiento (Gutiérrez, 2003) por su posible contención de elementos potencialmente tóxicos (EPT) y metales pesados (MP), que debido a la baja consolidación y tamaño de los jales, aumenta el riesgo de dispersarse o incorporarse a cuerpos de agua por lixiviación o movilizarse a otros ecosistemas de manera eólica o hídrica (Mendel et al., 2008), desde las pilas de almacenamiento de los residuos (Martínez-Becerril, 2009). La dispersión de los EPT y MP a otros ecosistemas se considera un problema grave dado que se contaminan suelos, sedimentos, aguas superficiales y subterráneas (Armienta et al., 2003) que en casos severos pueden estar directamente relacionados con la destrucción de los ecosistemas (Velasco et al., 2005).

***Metales pesados***

Los metales de forma general están clasificados en metales y no metales, delimitados por metaloides y semimetales (Appenroth, 2010). Los metales son elementos con la capacidad de conductividad eléctrica y térmica, puntos de fusión altos y electrones móviles, y en disoluciones forman iones electropositivos o cationes; además, presentan otras características como ductilidad, flexibilidad y brillo (Velasco et al., 2005; Appenroth, 2010). De acuerdo al papel que juegan dentro de los sistemas biológicos y su potencial como contaminantes ambientales, han sido clasificados los términos que agrupan algunos elementos metálicos y no metálicos, en función de su presencia en el suelo y su utilidad o toxicidad para los organismos (Bautista, 1999; Roldán, 2017). La clasificación hace énfasis en, elementos esenciales, traza o potencialmente tóxicos como los MP.

Los MP son definidos como elementos con densidad mayor a  $5\text{g/cm}^3$  en su forma elemental, además de ser elementos tóxicos en concentraciones muy bajas (Gutiérrez-Ruiz et al., 2007) y con propiedades tóxicas o genotóxicas (ATSDR, 2009). Biológicamente pueden ser considerados como elementos indispensables (traza) en el ciclo de vida ya que son utilizados como cofactores de moléculas biológicamente activas (Illizarriturri, 2010). Sin embargo, tras un aumento en su concentración se comportan como agentes tóxicos en los organismos; ejemplos de MP son: Cu, Cr y Zn entre otros. Algunos metales no esenciales y metaloides han sido considerados importantes desde un enfoque de riesgo ambiental debido a que su presencia en pequeñas cantidades es altamente tóxica, tal es el caso del As, Cd y Pb (Sánchez-Bain et al., 2004).

La toxicidad de los MP está causada principalmente por sus propiedades de bioacumulación y una deficiencia en la excreción de dichos elementos por los organismos (Navarro-Aviño et al., 2007). Otro factor que influye sobre la toxicidad de los MP es el estado de valencia en el que se encuentren. A su vez, los blancos de toxicidad de los MP son variables dentro de los organismos, pero principalmente son blanco de proteínas en su mayoría con actividad enzimática, provocando efectos negativos en procesos bioquímicos, membranas celulares y organelos, posterior al proceso de bioacumulación (Ferrer, 2003).

***Bioacumulación de metales pesados***

Existen una gran variedad de términos utilizados para describir la absorción y acumulación de EPT's y MP en sistemas biológicos. Muchos de estos términos han sido inconsistentes y en algunos casos confusos (Jorgensen, 2016). En la actualidad el término con mayor aplicación y uso para describir éste proceso es el de bioacumulación (Newman, 2014). La bioacumulación se define como la cantidad total de un contaminante que es absorbida y retenida por los organismos. Es el resultado de la asimilación de un contaminante en los diferentes compartimentos del ambiente, agua, aire o suelo (a través de la respiración, dieta o de forma cutánea). Incluye procesos como difusión pasiva, metabolismo, crecimiento y transferencia a la descendencia (Newman, 2014; Jorgensen, 2016; Roldán, 2017). Para la descripción del proceso de bioacumulación se utiliza el factor de bioacumulación, el cual se basa en la proporción del contaminante en el organismo en función a la concentración del

mismo en sus fuentes potenciales, dieta o el medio en el que se encuentran expuestos los grupos en cuestión (Jorgensen, 2016). Este factor de bioacumulación ha permitido elucidar en organismos acuáticos la capacidad de bioacumular más de 100 veces la concentración de algunos MP (Mackay y Clark, 1991; Roldán, 2017).

La bioacumulación de MP también depende de las propiedades fisicoquímicas de cada metal y la presencia de agentes con los que los MP se pueden unir como los grupos Hidroxilo (OH<sup>-</sup>) y Amoníaco (NH<sub>3</sub>), el potencial óxido-reducción, el control por parte de componentes en los sedimentos (materia orgánica, óxido de hierro) y la forma del elemento (orgánica- inorgánica, estado de oxidación; Baqueiro et al., 2007). Una serie de factores importantes a considerar dentro del proceso de bioacumulación es la ruta, el tiempo y la exposición, los cuales influyen en conjunto en la concentración de MP en los organismos (Jakimska et al., 2011a). La ruta hace referencia a la vía por la que los MP son adquiridos por los organismos, ejemplos de ello son: la dieta, respiración, difusión por la piel o transferencia materna.

La dieta es considerada como la principal vía de exposición para la bioacumulación en tejidos de MP como Cd, Co, Hg y Zn (Penicaud et al., 2017). El tiempo de exposición depende en gran medida de la edad del organismo, así como de su capacidad de desplazamiento. El tiempo de exposición puede incrementar o disminuir de acuerdo a la permanencia del organismo en sitios contaminados con MP. A su vez, la intensidad de exposición está en función de la concentración de los MP en el ambiente en el que se desarrollan los organismos, teniendo en consideración que los ambientes con mayores niveles de MP implican mayor intensidad (Jakimska et al., 2011a). Asimismo, las condiciones biológicas en las que se encuentran los organismos también tienen influencia sobre la bioacumulación de MP (Mussali-Galante et al., 2013).

Las condiciones biológicas que tienden a incrementar o disminuir la incorporación, acumulación o eliminación de MP en los organismos son el estado de desarrollo (huevo, larva, embrión, juvenil, adulto) o madurez, la talla corporal, el sexo, el grado de actividad, el estado físico, la presencia de estructuras adicionales (p.ej., escamas, caparazón), la dieta y la presencia de adaptaciones fisiológicas particulares (Jakimska et al., 2011a). En el caso del estado de desarrollo por ejemplo, los juveniles pueden presentar un desarrollo incompleto en los órganos encargados de la eliminación de MP, en comparación con adultos (Nixon y Mangold, 1998; Roldán, 2017). Dentro de las adaptaciones fisiológicas, se conocen procesos de desintoxicación dentro de las células, donde se involucran proteínas como metalotioneínas, ferritina y proteínas de choque térmico, que se unen a los iones, lo que facilitan su eliminación. Sin embargo, este proceso puede saturarse por lo que no provee de una protección permanente ante la exposición crónica a los diferentes MP y sus mecanismos de toxicidad (Prasanna, 2002).

### ***Mecanismos de toxicidad de los metales pesados***

Los MP son tóxicos que interfieren negativamente con funciones celulares indispensables para sobrevivencia de los organismos por mecanismos complejos, entre los que destacan:

1. **ERO, estrés oxidativo:** Incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno que son potencialmente tóxicas y provocan la oxidación de proteínas, lípidos e incluso se les relaciona con daños en el ADN (Schieber y Chandel, 2014)
2. **Mimetismo:** Similitud con metales esenciales en el estado de valencia (Ballatori, 2002).
3. **Inhibición enzimática:** Formación de complejos metal-proteína con inactivación enzimática (Nava-Ruíz y Méndez-Armenta, 2011).
4. **Genotoxicidad:** Ruptura de DNA, puentes DNA-proteína, aberraciones cromosómicas e intercambios de cromátidas (Phillips y Arlt, 2009).

### ***Efectos de los metales pesados a nivel individual: fisiología de los organismos***

La concentración de metales puede tener efectos positivos y negativos en los organismos (Jakimska et al., 2011a). Los efectos positivos están relacionados con concentraciones adecuadas de elementos esenciales (Mn, Fe, Co, Cu, Zn y Mo); dichos metales deben mantenerse en concentraciones estables para mantener el correcto funcionamiento de las funciones biológicas como la activación enzimática, funciones nerviosas, contracción muscular, regulación electrolítica y la producción de hormonas (Bánfalvi, 2011). Los efectos negativos están relacionados con elementos esenciales en concentraciones elevadas (Cu, Ni, Zn) (Volke et al., 2005) o con elementos no esenciales (Pb, Hg, Cd, Sb, Cr y As), que tienden a ser tóxicos incluso en concentraciones bajas (Jakimska et al., 2011a; Roldán, 2017).

Los efectos tóxicos de los MP varían entre elementos, pero los efectos se pueden resumir en inhibiciones enzimáticas ( $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  pueden reemplazar al  $\text{Zn}^{2+}$  y el  $\text{Be}^{2+}$ , lo que provoca la inactivación de las enzimas a las que se unen), celulares (inhibición de la respiración celular), tisulares (irritación o corrosión de epitelios, alteraciones histopatológicas, destrucción de eritrocitos) y del sistema endócrino, respiratorio, nervioso, inmune, digestivo y reproductor (interferencia en señales nerviosas, inhibición de neurotransmisores, parálisis, ulceraciones gastrointestinales, fallas respiratorias, disfunción renal, necrosis del hígado, envenenamiento en branquias) (Bánfalvi, 2011). En anfibios se han reportado evidencias de los efectos tóxicos de Cd, Cr, Cu, Pb, Mg y Zn en estadios larvarios y la fase adulta (Park et al., 2012), además de su relación con la reducción de la tasa de crecimiento, supervivencia e incremento de anomalías durante el desarrollo (Muñoz-Escobar y Palacio-Bahena, 2010), procesos cancerígenos así como daños irreversibles que provocan la muerte de los organismos o alteraciones morfológicas de importancia (Burguer y Gochfeld, 2000).

### ***Efecto de los metales pesados sobre la morfología de los organismos***

La manifestación de efectos negativos de los MP sobre la morfología de los organismos dulceacuícolas, depende de la solubilidad y biodisponibilidad de los MP por acción del pH (Carvalho y Fernandes, 2006). En anuros expuestos a contaminación por MP se han observado diferentes efectos morfológicos como: curvatura de la espina, bradigenesis, daños en la piel, hidropesía, anomalías en pigmentación, branquias, desarrollo de estructuras más pequeñas longitud de la cola, ancho de cabeza, diámetro del disco oral (Severtsova et al., 2012a; Severtsova et al., 2012b; Severtsova y Aguillón-Gutiérrez, 2013; Aguillón-Gutiérrez y Ramírez-Bautista, 2015). Otros trabajos también han reportado cambios morfológicos en hígado en zonas altamente contaminadas con MP, lo que podría ser indicativo de la respuesta adaptativa de este órgano, mediante mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, para disminuir la bioacumulación de MP en los organismos (Fenoglio et al., 2005).

Los anfibios son organismos altamente sensibles a la exposición a elementos potencialmente tóxicos como los MP, y se ha observado que tras la exposición a concentraciones elevadas de anfibios en estadíos larvarios, provocan interferencia sobre la tiroides (Facemire et al., 1995) y los procesos que esta glándula controla para la metamorfosis (Fort et al., 2000), lo que puede relacionarse con el retraso en la absorción en el tejido de la cola en los renacuajos (Unrine et al., 2004a), además de retrasos en el desarrollo de las patas posteriores (Muñoz-Escobar y Palacio-Bahena, 2010). Efectos morfológicos se han observado en el desarrollo de estructuras óseas de diversos grupos de vertebrados por exposición a metales pesados, en anuros (Severtsova et al., 2012a; Severtsova et al., 2012b; Severtsova y Aguillón-Gutiérrez, 2013; Aguillón-Gutiérrez y Ramírez-Bautista, 2015), en peces (Bhattacharya et al., 1989; Agyekum et al., 2012), roedores (Sin y Teh, 1992) y humanos (McGregor y Mason, 1991). Las alteraciones provocadas en la morfología de las especies por la exposición de los organismos a contaminantes, pueden estar relacionadas a su vez con la conducta, efectos a nivel poblacional y comunidades.

### ***Efecto de los metales pesados a nivel poblacional***

Los estudios que han abordado las poblaciones bajo estrés metálico, se basan en principalmente en los cambios en la diversidad genética, así como, patrones en la frecuencia de alelos utilizando biomarcadores moleculares neutros (Bickham et al., 2000, Mussali-Galante et al., 2013), las cuales son secuencias de ADN polimórficas dentro de las poblaciones o especies y no se encuentran bajo selección y tienen un papel importante en la estimación de la diversidad genética (Arif y Khan, 2009). El uso de este tipo de marcadores brindan información sobre aspectos de demografía de las poblaciones ya que poseen la facultad de medir cambios en los tamaños poblacionales en respuesta al cambio y adaptación al ambiente (Sparling y Fellers, 2007). El uso de marcadores neutros (ADN mitocondrial, aloenzimas, polimorfismo de fragmentos de restricción, microsatélites, ADN polimórfico aleatorio amplificado) puede ser utilizado para monitorear los efectos

provocados por la exposición de las poblaciones a la contaminación (Medina et al. 2007). Como resultado de la exposición a contaminación por MP las poblaciones experimentan cambios en la proporción de sexos, estructura de edades, bajo éxito reproductivo, endogamia, alteraciones en la diversidad genética, baja aptitud, población en crecimiento negativo (Mussali-Galante et al. 2013), que potencialmente afectan a nivel comunidad.

***Efecto de la bioacumulación de metales pesados a nivel comunidad***

Los efectos provocados por la contaminación por metales sobre una comunidad se ven reflejados principalmente en cambios de la composición, dominancia, riqueza, y diversidad de especies (Mussali-Galante et al., 2013). Las interacciones entre las especies que conforman las comunidades dificultan la predicción de los efectos de los MP con precisión ya que los efectos a nivel poblacional en sinergia con interacciones interespecíficas, provocan cambios en las comunidades (Forbes y Forbes 1993; Hopkin, 1993; Smith y Cairns, 1993). Los estudios que han evaluado las respuestas a nivel comunidad al estrés ambiental por MP han sido realizados en ecosistemas acuáticos utilizando comunidades de invertebrados (Clark y Clements 2006; Pollard y Yuan, 2006), peces (Theodorakis et al., 2000) y anfibios (Relyea, 2005; Reques, 2008; Ficken y Byrne, 2012; Suárez et al., 2016).

En dichos estudios los patrones observados son similares, y la mayoría han concluido en que existe una disminución en los valores de diversidad en los sitios con los niveles más altos de MP. A su vez, también se han establecido relaciones de concentración-respuesta entre los MP y la riqueza de especies en gradientes de contaminación (Pollard y Yuan, 2006). Además se ha observado que incluso después de periodos de hasta 110 años los MP siguen presentes en el ambiente (Ridolfi, 1993) manteniendo efectos sobre la estructura de las comunidades de anuros (Lefcort et al., 1998). Específicamente el aumento en las concentraciones de Pb, Cd y Zn en matrices ambientales como suelo y agua (Hall y Mulhern, 1984; 1989; Freda, 1991; Horne y Dunson 1995), ha sido relacionado con la disminución de los valores de diversidad de las comunidades de anuros (Lefcort et al., 1998; Ficken y Byrne, 2012).

Particularmente se ha observado que los anfibios son altamente sensibles a los cambios en el ambiente por acción de MP (Reques, 2008; Car y Patiño, 2011). Ya que los MP tienden a modificar la estructura del hábitat, por ello se ha sugerido que la descripción e identificación de patrones y respuestas de las comunidades de anfibios tropicales, sean consideradas como caóticas o impredecibles y así clasificar a las especies de anfibios bioindicadoras para cada tipo de estrés dentro de los hábitats (Mc Diarmid, 2001).

***Anfibios como bioindicadores de contaminación ambiental***

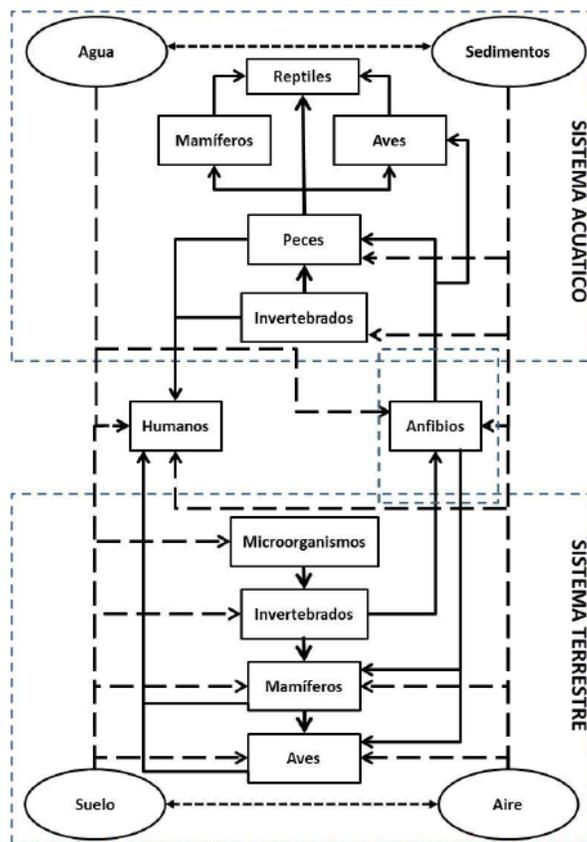
Los anfibios son un grupo de vertebrados con morfologías externas similares como: piel lisa y muy vascularizada sin escamas, plumas o pelo, lo que facilita el intercambio de gases y a su vez incluye glándulas lechosas y mucosas cuya función es humectar la piel y la secreción de toxinas como mecanismo de defensa (Duellman y Trueb, 1994; Halliday y Adler, 2007). También, presentan huevos anamniotas carentes de membranas

extraembrionarias, lo que los hace altamente dependientes de ambientes húmedos para evitar la deshidratación (Vitt y Caldwell, 2013).

Los anfibios son un grupo prioritario dentro de los estudios de comunidades biológicas, ya que forman comunidades capaces de indicar el estrés ambiental por metales pesados (Blaustein et al., 1994, Pechmann y Wilbur, 1994; Rowe et al., 1996; Cordoba et al. 2013). Por sus características en morfología y fisiología con: piel “desnuda” y permeable, respiración branquial, pulmonar y cutánea, así como, la complejidad de sus ciclos de vida que incluyen etapas acuáticas y terrestres (Crump y Rodríguez, 2001; Heyer et al. 2001; Vosjoli, 2012; Wells 2007; Cruz-Elizalde et al., 2017; Aguillón-Gutiérrez, 2018). En etapas larvales los anfibios son altamente vulnerables a la exposición a metales pesados (Sparling et al. 2000; Aguillón-Gutiérrez, 2018) por lo que se les usa con mayor frecuencia en investigaciones ecotoxicológicas (Severtsova et al., 2012a; Severtsova et al., 2012b; Severtsova y Aguillón-Gutiérrez, 2013; Aguillón-Gutiérrez y Ramírez-Bautista, 2015; Cruz-Elizalde et al., 2017; Aguillón-Gutiérrez, 2018), facilitando la evaluación de los hábitats acuáticos y terrestres, ya que los anfibios funcionan como receptores de metales pesados en ambos ambientes (Agostini, 2013; Cruz-Elizalde et al., 2017; Aguillón-Gutiérrez, 2018).

Asimismo, la mayoría de las especies de anfibios particularmente los anuros presentan baja movilidad ya que los adultos no se alejan de los sitios de eclosión y desarrollo larval, por lo que funcionan como bioindicadores a nivel local (Blaustein y Johnson, 2003). Además permiten evidenciar cambios en la tasa de crecimiento, pigmentación y desarrollo de deformidades morfológicas por su alta sensibilidad a MP (Cooke, 1981; Rowe et al. 1996; Eisler 2000; Sparling et al., 2006; Severtsova et al., 2012a; Severtsova et al., 2012b; Severtsova y Aguillón-Gutiérrez, 2013; Aguillón-Gutiérrez y Ramírez-Bautista, 2015). De igual forma las características de los anfibios los hacen vulnerables ante alteraciones en las condiciones naturales en los hábitats por la contaminación de metales pesados (Aguillón-Gutiérrez y Ramírez-Bautista, 2015; Cruz-Elizalde et al., 2017; Aguillón-Gutiérrez, 2018) lo que puede comprometer la existencia de especies de anfibios con baja capacidad de adaptación y dispersión (Rueda, 1999, Urbina-Cardona y Londoño, 2003). Dada la complejidad en los ciclos de vida de los anuros y su estrecha relación entre los ecosistemas acuáticos y terrestres, las rutas de exposición a metales pesados pueden ser primarias para los anfibios, contrario a otros grupos como aves, reptiles o mamíferos (Ilizaliturri, 2010; Figura 1).

Gracias a las características de los anfibios particularmente los anuros, grupo altamente diversificado, principalmente en los trópicos (Heyer et al, 2001; Parra-Olea et al., 2014), estos se han consolidado como excelentes modelos de investigación ecológica, biomédica y ecotoxicológica, ya que al ser vertebrados con un ciclo de vida bifásico, con una fase larvaria acuática y la fase adulta terrestre, han facilitado la comprensión de las rutas de exposición y bioacumulación de los MP (Ilizaliturri, 2010), así como, su posible relación con las anomalías y patologías causadas en dichos organismos, sin la necesidad de experimentar con vertebrados de mayor talla (Aguillón-Gutiérrez, 2018).



**Figura 1.** Diagrama de las rutas de exposición de anfibios. Las líneas punteadas representan las rutas de exposición relacionadas con algún compartimento ambiental y las líneas sólidas son las rutas que están relacionadas con la ingesta. (Tomado de Illizarriturri, 2010).

## Antecedentes

En las últimas décadas la publicación de estudios ecotoxicológicos que utilizan anuros como modelo han incrementado desmesuradamente posterior al primer congreso de Herpetología, llevado a cabo en Inglaterra en 1989, en el que se evidencio el declive de las poblaciones de anfibios a nivel mundial (Morínigo, 2016). Este declive se ha asociado a múltiples razones como la modificación y pérdida de hábitat, especies exóticas, parásitos, contaminación, radiación UV y cambio climático (Relyea, 2005).

### *Bioacumulación de metales pesados en anuros*

Los primeros estudios de bioacumulación en anuros fueron realizados con insecticidas organoclorados como el DDT (Licht, 1976), paration (Hall, 1990) y MP (e.g. Hg y Pb) (Bank et al., 2007; Jofré et al., 2012). Sin embargo, actualmente son pocos los estudios que analizan la bioacumulación ya que apenas representan 8.21% de las publicaciones ecotoxicológicas que usan a los anuros como modelo de estudio (Morínigo, 2016). Los estudios sobre bioacumulación de metales pesados en anuros, están enfocados principalmente en los efectos individuales de los contaminantes, así como, los efectos consecuentes de bioacumulación como teratogénesis y toxicidad (Morínigo, 2016).

Bank et al. (2007) observaron que la bioacumulación en laboratorio de Hg y metilmercurio en *Lithobates clamitans* y *Lithobates catesbeianus* (antes *Lithobates catesbeiana*), los niveles más altos de ambos compuestos en *R. clamitans*. El metilmercurio comprendió del 7.6 al 40% de Hg total en el tejido en peso fresco de los renacuajos. Para el caso de los sedimentos evaluados, los niveles de Hg fueron similares o ligeramente superiores al nivel umbral de la concentración establecido para sedimentos de agua dulce (0.174 mg/kg peso seco). Los autores indican que las redes tróficas en los ambientes acuáticos son altamente susceptibles a niveles altos de bioacumulación total de Hg.

Jofré et al. (2012) evaluaron las concentraciones de Pb y Cd en *Rhinella arenarum*, *Leptodactylus mystacinus*, *Hypsiboas cordobae*, *Odontophrynus occidentalis*, *Melanophryniscus stelzneri*, *Pleurodema tucumanum* de anuros encontradas en un lago artificial de la zona árida de Argentina, el cual representa un refugio para las especies de anuros nativas. Los anuros recolectados en la costa sur presentaron concentraciones mayores de Cd 21% más y 40 % más Pb que los anuros recolectados en la costa norte con concentraciones menores de Cd y Pb. A nivel poblacional y entre especies se detectaron diferencias en la bioacumulación de Cd y Pb. Se detectaron diferencias significativas ( $t = -4.14$ ;  $P = 0.05$ ) entre *R. arenarum* y *L. mystacinus* en la bioacumulación de Pb. No se detectaron diferencias significativas ( $t = -1.05$ ;  $P = 0.32$ ) en la bioacumulación de Cd entre *R. arenarum* y *L. mystacinus*. En *R. arenarum* la bioacumulación de Pb fue significativamente superior a la de Cd ( $F_{(1,9)} = 5.34$ ;  $P < 0.05$ ). En *L. mystacinus* la bioacumulación de Cd fue mayor a la de Pb sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre la bioacumulación de ambos metales ( $F_{(1, 5)} = 3.42$ ;  $P = 0.11$ ). La bioacumulación de Cd y Pb no tuvo correlación significativa con la concentración de agua en el sitio.

Córdoba et al. (2013) evaluaron la bioacumulación de Hg en el ensamblaje de larvas de anuros en medio Dagua, Buenaventura Colombia donde existe la presencia de actividades mineras y donde se han liberado al río Dagua cantidades considerables de cianuro. Los resultados obtenidos revelaron diferencias significativas (M-W Utest,  $p = 0.001$ ) entre la concentración de Hg en sedimentos del río y la bioacumulación de Hg en larvas de anuros. De igual forma la cantidad de Hg bioacumulado en larvas de anuros fue mayor que las concentraciones de sedimento. Teniendo en cuenta que los renacuajos de las especies evaluadas son consumidores primarios, al poseer cargas altas de metales en sus tejidos, los organismos que estén en niveles superiores que sean depredadores de renacuajos podrían presentar procesos de biomagnificación.

### ***Efectos de la bioacumulación de metales pesados sobre la morfología de anuros***

Una cantidad considerable de estudios que evalúan los efectos teratogénicos, se han realizado en condiciones de laboratorio, debido a la complejidad de realizar este tipo de estudios en condiciones naturales (Bank et al., 2007; Sztrum, 2010; Peltzer et al., 2011; Córdoba et al., 2013). Los estudios que han analizado los efectos teratogénicos en condiciones de laboratorio, de forma general ha observado que la bioacumulación de

metales son superiores a la bioacumulación observada en muestras de campo, de igual manera los estudios de bioacumulación están limitados a utilizar larvas, razón por la que no es común el reporte de malformaciones en anuros en condiciones naturales (Mann et al., 2009).

Severtsova et al. (2012b) reportaron en la ciudad de Moscú, Rusia y alrededores que las larvas de *Rana temporaria* y *R. arvalis* que se desarrollaron en ambientes contaminados por metales pesados, presentaron una variedad considerable de anomalías morfológicas. Las larvas evaluadas presentaron curvatura de la espina dorsal, daños en piel y anomalías en agallas. También se menciona que en algunos organismos existieron combinaciones de malformaciones, por lo que era imposible identificar cada una de ellas.

Aguillón-Gutiérrez (2012) observó diferentes anomalías en larvas de *Rana arvalis* que fueron expuestas en un bioensayo a Pb y Fe (6 g/L para cada metal), donde las principales malformaciones fueron la ausencia de la extremidad posterior izquierda, ausencia de la extremidad anterior izquierda, intestinos fuera la cavidad abdominal, curvatura de la base de la cola, curvatura en la parte media de la cola, curvatura de la espina en dirección ventral y curvatura de la espina en dirección dorsal

Aguillón-Gutiérrez y Ramírez-Bautista (2015) en un bioensayo realizado con larvas de *Dryophytes plicatus* observaron que en el grupo control, la mayoría de los individuos resultaron sin anomalías, sin embargo, reportan que los individuos expuestos tratamientos con concentraciones de Pb y Fe de 3.7 g/L para cada metal, observaron anomalías en los individuos de ambos tratamientos, donde las principales anomalías fueron curvatura de la espina, ausencia de extremidades, intestinos fuera de la cavidad abdominal, anomalías en piel (desprendimiento de piel) y anomalías en la pigmentación de piel y vísceras.

### ***Efectos de la bioacumulación de metales pesados sobre la estructura de comunidades***

Los estudios que se han evaluado la estructura de comunidades de anuros expuestas a MP son pocos. Sin embargo, algunas observaciones de una comunidad de anuros fueron realizadas por Reques (2008) en el río Guadamar en España, donde hubo un accidente por derrame de lodos compuestos principalmente por Fe, Cu, Pb, Zn, As, Cd. En este estudio se reporta una disminución en valores de diversidad de anuros ( $H' = 0$ ) en la zona afectada por los lodos mineros en comparación con las zonas que no fueron afectadas por los lodos mineros ( $H' = 0.7$ ). Los autores concluyen que los cambios en la diversidad de especies pueden estar relacionados a la destrucción de los hábitats reproductivos, lo que puede resultar en alteraciones de las poblaciones aledañas que no han sido afectadas de manera directa por contaminación.

Suárez et al. (2016) analizaron las concentraciones de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn y As en un gradiente de contaminación de 19.48 km en el río Marabasco en Colima, México. Los resultados observados indican que los niveles de metales pesados cuantificados no sobrepasan la normatividad internacional a excepción del Cu que presentó niveles elevados en sedimentos. Los niveles del resto de MP estuvieron dentro de lo establecido en la normatividad internacional. Los autores reportan la bioacumulación de metales pesados en

hígado de *Rhinella horribilis*, donde el metal de mayor importancia fue el Cu. En este estudio la bioacumulación de metales no tuvo relación con la disminución de los valores de diversidad de la comunidad de anuros del río Marabasco.

En general existen especies que tienden a ser más o menos sensibles a cambios ambientales dentro de los hábitats donde viven, dentro de estos, los anfibios han sido estudiados y utilizados como indicadores de contaminación ambiental por metales pesados a en otras regiones de México así como en Sudamérica (Cuadro 2). Para Sierra de Huautla se han evaluado diferentes grupos de plantas, roedores, artrópodos y la población humana y su relación con los efectos negativos por la exposición a los MP (Cuadro 3). Sin embargo no existen trabajos que describan la dinámica de las comunidades de anuros, ni que evalúen el efecto de MP sobre las comunidades que habitan en la zona cercana a jales mineros de Sierra de Huautla. A continuación se presentan algunos estudios de caso en el sitio de estudio.

**Cuadro 2.** Antecedentes de estudios ecotoxicológicos con anuros en ambientes contaminados con metales pesados.

| Cita   | Especies   | Tejido     | Metales                        | Observaciones  |
|--|--|------------|--------------------------------|--|
| <b>Muñoz-Escobar y Palacio-Baena, 2010</b>   | <i>Dendrosophus bogerti</i>  | Renacuajos | HgCl <sub>2</sub> <sup>2</sup> | La especie <i>D. bogerti</i> es sensible a la exposición al cloruro de mercurio en ambientes acuáticos, con efectos desfavorables sobre el crecimiento y la tasa de desarrollo.  |
| <b>Illizarriturri, 2010</b>  | <i>Rhinella horribilis</i>   | Hígado     | Pb                             | Evidencia que los niveles de Pb no sobrepasan los niveles permitidos por la normatividad mexicana, y las concentraciones encontradas en el sitio de estudio representan alta exposición y marcados efectos subletales para las poblaciones de <i>R. horribilis</i> y otras especies del humedal. |
| <b>Córdoba et al., 2013</b>  | <i>Lithobates vaillanti</i><br><i>Rhinella margaritifera</i> ,<br><i>R. horribilis</i><br><i>Hypsiboas rosenbergi</i><br><i>Smilisca phaeota</i>   | Renacuajos | Hg                             | Larvas de las especies estudiadas presentaron concentraciones de mercurio mayores a las concentraciones registradas en los sedimentos significativamente diferentes (M-W Utest, p = 0.001).  |
| <b>Rendon, 2014</b>  | <i>Rhinella horribilis</i>   | Hígado     | Cr, Ni, Cu, Zn, As, Cd y Pb    | Bajas concentraciones de metales en hígado de <i>R. horribilis</i> . Sólo Cu presento concentraciones elevadas en hígado y sedimentos en todos los sitios.   |
| <b>López, 2015</b>   | <i>Lithobates clamitans</i> ,<br><i>L. catesbeiana</i> ; <i>R. marina</i> , <i>H. rosenbergi</i> ,<br><i>R. margaritifera</i> , <i>L. vaillanti</i> <i>S. phaeota</i> y<br><i>Dendrosophus bogerti</i> | Renacuajos | Hg                             | Demostó que los renacuajos evaluados bioacumulaban el mercurio proveniente de aguas contaminadas. Reportó anomalías en la última fase larvaria sobre el crecimiento debido a alteraciones enzimáticas.   |
| Las abreviaturas indican la fórmula química de los compuestos y metales pesados donde: HgCl <sub>2</sub> cloruro de mercurio, Pb) plomo, Hg) mercurio; Cr) cromo; Ni) níquel; Cu) cobre; Zn) zinc; As) arsénico; Cd) cadmio. |  |            |                                |  |

**Cuadro 3.** Antecedentes de estudios ecotoxicológicos en el ejido Huautla.

| Cita                           | Especie  | Metales pesados                | Observaciones   |
|--------------------------------|--|--------------------------------|---|
| <b>Martínez-Becerril, 2009</b> | Comunidad vegetal<br>(árboles, arbustos y herbáceas) | -                              | Reporta 98 especies vegetales para la microcuenca Huautla. El sitio testigo presentó 78 especies vegetales. El jal presentó 19 especies vegetales, siendo evidente una disminución de riqueza de especies arbóreas, arbustivas y herbáceas. Los valores de diversidad de Shannon-Wiener y Simpson fueron significativamente mayores para árboles, arbustos y herbáceas en el sitio control respecto al sitio de jal.  |
| <b>Hernández-Gómez, 2015</b>   | Comunidad de<br>Ácaros y Colémbolos                  | Pb, Cd, Cu, Zn                 | Comprueba la existencia de un gradiente de concentración de MP, donde las concentraciones disminuyen con la lejanía al jal. Los valores de riqueza y abundancia de ácaros y colémbolos se relacionaron negativamente con las concentraciones de MP y la cercanía al jal. Los valores de diversidad de Shannon-Wiener de ácaros y colémbolos no se relacionaron negativa y significativamente con la cercanía al jal y el incremento de las concentraciones de MP. |
| <b>González-Brito, 2015</b>    | Comunidad de artrópodos y<br>arácnidos               | Cu, Pb y As                    | Comunidad representada por 17 órdenes de artrópodos y 27 familias de arañas. Los valores de riqueza de familias registraron los valores más bajos en los sitios de jal de 0 a 150m ( $S=9$ ). La menor diversidad de Shannon-Wiener de artrópodos se registró a los 1500m ( $H'=0.834$ ) y la mayor diversidad a los 300m ( $H'=1.611$ ).   |
| <b>Eligio-González, 2017</b>   | Comunidad de líquenes                                | Al, Cu, Fe, Mn,<br>Ni, Pb y Zn | La comunidad liquénica en <i>Acacia farnesiana</i> registró los valores más altos de diversidad en el jal 2 ( $S=22$ ; $H'=2.5654$ ; $D=9.036$ ). Los valores de diversidad Shannon-Wiener y Simpson se registraron en el jal 1 para <i>Pithecellobium dulce</i> ( $S=15$ , $H'=2.39$ y $D'=9.036$ ) y <i>Prosopis laevigata</i> ( $S=13$ , $H'=2.136$ y $D'=7.135$ ).  |

Las abreviaturas indican la fórmula química de los MP donde: Pb) plomo; Mn) manganeso; Ni) níquel; Cu) cobre; Zn) zinc; As) arsénico; Cd) cadmio; Al) aluminio; Fe) hierro.

## Justificación

A pesar de que la relación de los MP con diversos componentes biológicos y ambientales han sido estudiados con anterioridad en el ejido Huautla, no se ha llevado a cabo un análisis ecotoxicológico de MP en anfibios, uno de los grupos biológicos con mayor valor indicador y cuyo hábitat comprende el ecotono de ríos. Estos organismos habitan donde ocurren procesos ecológicos y físicos diferentes de los que ocurren en medios terrestres. Por ello, se realizó el estudio de las comunidades de anuros a lo largo de un gradiente de contaminación por MP en el río Huautla (Morelos, México) donde existen jales mineros. La información generada facilitará el conocimiento de los efectos potenciales de los MP en exposiciones crónicas sobre las propiedades de la comunidad de anuros.

El presente estudio evaluó el estado actual de las concentraciones de MP en el gradiente de contaminación y puede identificar a las especies de anuros que pudieran funcionar como herramienta potencial de diagnóstico ambiental en el diseño de estrategias de prevención y control de contaminación. Generará asimismo conocimiento básico sobre los efectos potenciales tóxicos de los MP y su posible relación con las propiedades de la comunidad de anuros de la zona de estudio.

## Objetivo General

Cuantificar la bioacumulación de metales pesados en anuros a lo largo de un gradiente de contaminación por un jal y explorar su potencial relación sobre la estructura de la comunidad.

### *Objetivos particulares*

- Conocer la concentración de Zn, Fe, Cr, Cd, Pb, Mn y Cu en agua y sedimentos del río Huautla.
- Conocer la bioacumulación de Zn, Fe, Cr, Cd, Pb, Mn y Cu en el hígado de *Rhinella horribilis*, *Lithobates spectabilis* y *Smilisca baudinii*.
- Caracterizar la comunidad de anuros a través de un gradiente de contaminación por jales mineros.
- Evaluar la posible influencia de la bioacumulación de metales pesados sobre la estructura de la comunidad de anuros.

## Hipótesis

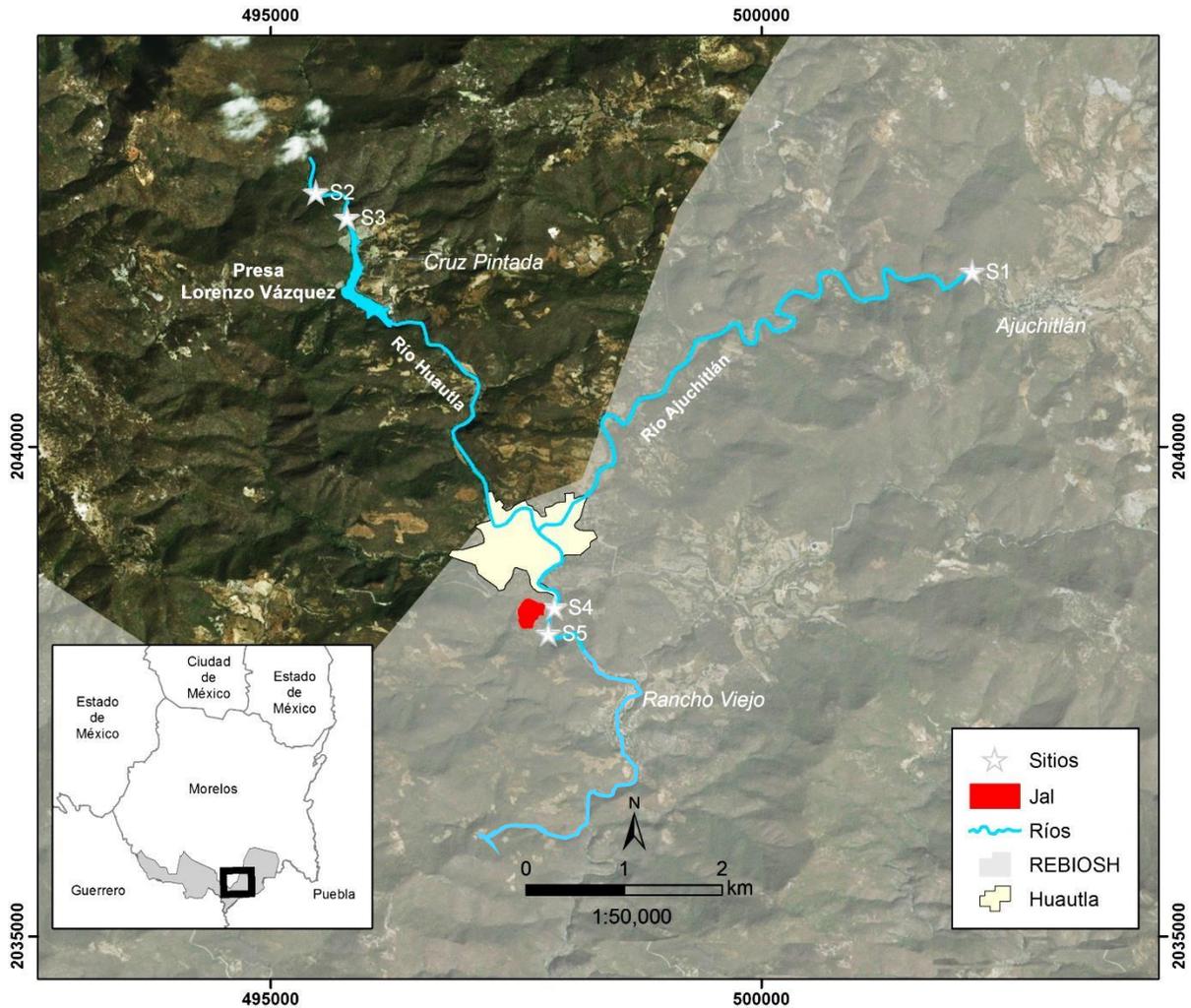
- Si los jales mineros son fuente de MP que son contaminantes para el ecosistema acuático, se espera encontrar mayores concentraciones de MP en el sedimento, agua y anuros de los sitios cercanos a ellos y menores en sitios río arriba alejados del jal.
- Si los sitios ubicados en la cercanía a jales presentan mayores concentraciones de MP, entonces las comunidades de anuros en zonas cercanas a los jales presentarán menor diversidad, mayor dominancia, menor equidad y composición distinta a aquellos que se encuentran en sitios alejados y río arriba de los jales.

## Metodología

### *Descripción de los sitios de muestreo*

La zona de estudio se localiza en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH) en municipio de Tlaquiltenango al sur del estado de Morelos (Figura 2). El municipio forma parte del Eje Neovolcánico Transmexicano, así como de las sub provincias de las Sierras del sur de Puebla y de las Sierras y Valles de Guerrero. Asimismo, la microcuenca Huautla se encuentra inmersa en la región del Balsas, en la cuenca del río Atoyac y el río Grande de Amacuzac, dentro de la subcuenca que comprende los Ríos Cuautla, Aplatlaco y Yautepec (CONANP, 2005). El clima predominante es cálido sub húmedo con lluvias en verano, característico de zonas con elevación menor a 1400 m.s.n.m. con una precipitación media anual de 909.8 mm siendo los meses más lluviosos de junio a septiembre, y una temporada de sequía de siete a ocho meses en los que los arroyos de la zona pierden la conectividad manteniendo únicamente charcas aisladas a lo largo de los arroyos. La temperatura media anual es de 24.1 °C. El principal tipo de vegetación es el bosque tropical caducifolio (Rzedowski, 2006), sin embargo, existen algunas áreas de selva mediana subcaducifolia, bosque de encino (*Quercus glaucooides*) y una pequeña isla de pino (*Pinus maximinoi*) en las zonas más elevadas de la Sierra (CONANP, 2005; INEGI, 2009).

Los sitios de estudio se localizan en el ejido Huautla. El sitio 1 (**S1**; Figura 3A) se localiza en las coordenadas UTM 14Q 502153 2041786 al noreste del poblado Huautla y al suroeste del poblado Ajuchitlán en el arroyo que lleva el mismo nombre, donde el tipo de vegetación es bosque de galería compuesto principalmente por especies de la familia Cupresace con una cobertura vegetal promedio de 51% en el sitio y su ubicación se encuentra corriente arriba del jal. El sitio 2 (**S2**; Figura 3B) se localiza en la ordenada UTM 14Q 495459 2042595 al noroeste del poblado Huautla en el sitio existe un mayor número de especies de bosque de galería además de encontrarse en una zona con pendientes escarpadas, muy semejante a una cañada, con una cobertura de 51% y corriente arriba del jal. El sitio 3 (**S3**; Figura 3C) se ubica en la coordenada UTM 14Q 495774 2042337 en la zona conocida como cola de la presa Lorenzo Vázquez; en el sitio existen actividades humanas, la vegetación predominante es un pastizal inducido con especies arbóreas de bosque tropical caducifolio y una cobertura de 55%, corriente arriba del jal. El sitio 4 (**S4**; Figura 3D) se ubica en la coordenada UTM 14Q 497893 2038355 a 500 metros dirección sur del poblado Huautla. En el sitio se localiza el jal residuo resultante de las actividades mineras realizadas en la zona, la vegetación está representada principalmente por especies de leguminosas y algunos individuos aislados de la familia Cupresace, con una cobertura vegetal promedio del sitio de 47%, el sitio se ubica a un costado del jal. El sitio 5 (**S5**; Figura 3E) se localiza en la coordenada UTM 14Q 497828 2038089 1.2 km al sur del poblado Huautla, donde la vegetación es principalmente de bosque tropical caducifolio con algunas especies características del bosque de galería aisladas dentro del arroyo, la cobertura promedio del sitio es de 48%, el sitio se localiza corriente abajo del jal. La estimación de la cobertura vegetal de los sitios se realizó mediante la aplicación Canopeo versión 2.0 para sistema operativo iOS (Patrignani y Ochsner, 2015).



**Figura 2.** Mapa de la zona de estudio con la localización de los sitios de muestreo. Las abreviaturas indican: **S1)** sitio 1; **S2)** Sitio 2; **S3)** Sitio 3; **S4)** Sitio 4; **S5)** Sitio 5. Se muestra el mapa llave del Estado de Morelos (Arriba, izquierda) con la ubicación del poblado Huautla dentro de la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla (REBIOSH). Las estrellas indican la ubicación física de los sitios de muestreo. Se muestra la ubicación de las poblaciones cercanas al poblado Huautla: Ajuchitlán y Rancho Viejo, Paraje Cruz Pintada y la Presa Lorenzo Vázquez. En rojo se muestra la ubicación física del Jal. En azul se muestra el recorrido del Río Huautla y el Arroyo Ajuchitlán, así como el punto de unión de ambos. La región sombreada en gris representa el polígono de la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla.

---

Sitios corriente arriba del jal

---

---

Sitios cercanos al jal

---

A) S1



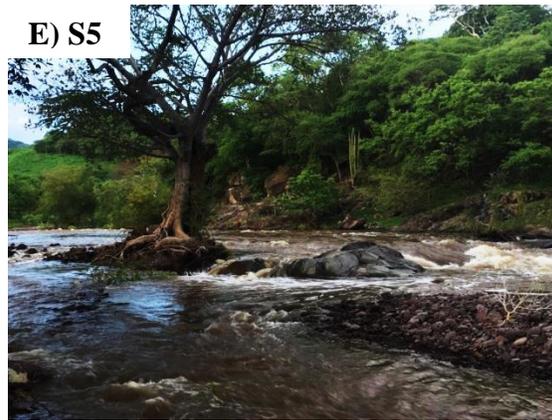
D) S4



B) S2



E) S5



C) S3



---

**Figura 3.** Sitios de muestreo. Se muestra la estructura física de los sitios de estudio. Las letras indican: A) Sitio 1; B) Sitio 2; C) Sitio 3; D) Sitio 4; E) Sitio 5.

---

***Muestreo de agua y sedimento***

En el mes de enero de 2019 que comprende la temporada de sequía se realizó una visita a los sitios de muestreo con el fin de obtener muestras de agua y sedimento para cuantificar las concentraciones de Pb, Cd, Mn, Cr, Cu, y Zn. Se tomaron tres muestras de agua y tres de sedimento por sitio de materia orgánica particulada fina. Las muestras de agua fueron envasadas en frascos de plástico previamente utilizando el procedimiento de la NMX-AA-051-2016, los cuales fueron transportados al laboratorio en hieleras a 4 °C y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su análisis. El muestreo de sedimento se llevó a cabo de acuerdo al método propuesto por la NMX-AA-112-SCFI-2017 y los lineamientos de la NMX-AA-014-1980. Las muestras de sedimento fueron tomadas con una pala de plástico y envasadas en bolsas Whirl-pak (polietileno denso) de 500 mL. Asimismo, fueron transportadas en hieleras a 4°C al laboratorio y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de analizar las concentraciones de metales pesados. Se analizaron un total de 15 muestras de agua y 15 muestras de sedimento. La cuantificación de metales pesados se realizó siguiendo el método propuesto por la NMX-AA-051-SCFI-2001 para análisis de agua y determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas. Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales (L.I.A), Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

***Medición de sólidos suspendidos volátiles (SSV)***

Debido a que los MP se encuentran asociados con sedimentos orgánicos se implementó el procedimiento propuesto por la norma mexicana NMX-AA-034-SCFI-2015 de medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales, y residuales tratadas. Fueron introducidos crisoles al horno a una temperatura de 105 °C ± 20 °C durante 40 minutos, para llevarlos a peso constante. Los crisoles una vez que estuvieron en peso constante con una variación en peso de < 0.0005 g en dos mediciones fueron cargados con la muestra de sedimento y colocados en una mufla a 550 °C ± 50 °C durante 1 hora y después en un horno a 105 °C ± 20 °C durante 20 minutos. Una vez retirados del horno se colocaron en el desecador durante 20 min y posteriormente fueron pesados. El procedimiento se realizó en el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA). Para cada muestra se determinó la cantidad de SSV mediante la expresión:

$$SSV = (m1 - m2) \quad (1)$$

Dónde:

m1= masa del crisol con el sedimento posterior a la evaporación, en gramos.

m2= masa del crisol con el sedimento posterior a la calcinación, en gramos.

***Criterios de selección de anuros para análisis de metales pesados***

Durante los muestreos de junio y julio de 2018 con el objetivo de obtener ejemplares para sacrificio y análisis de MP fueron seleccionadas las especies más abundantes con hábitos acuáticos, terrestres y arborícolas por sitio, siguiendo los siguientes criterios:

1) *Que no estén bajo ninguna categoría de protección* dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010 y la IUCN, 2019; 2) *historia de vida conocida* (aspectos de nicho, dieta, uso de hábitat, período reproductivo, longevidad, conducta); 3) *que tengan talla conveniente* (80mm, relacionado con la cantidad de muestra 0.25g) requerida para las técnicas de cuantificación de metales pesados y biomarcadores de efecto); 4) que tengan *facilidad de captura y manejo* (especies conspicuas, y 5) *que sean abundantes* (Ilizaliturri, 2010). Las especies seleccionadas fueron:

1. *Rhinella horribilis*
2. *Lithobates spectabilis*
3. *Lithobates zweifeli*
4. *Smilisca baudinii*

### **Contención y sacrificio de anuros**

La captura y contención de anuros adultos colectados se realizó en bolsas de plástico Ziploc para el traslado al laboratorio. Las bolsas fueron rotuladas en el exterior y se colocó una etiqueta en el interior de la bolsa. En laboratorio, los individuos previamente sedados con cloroformo, fueron sacrificados por desmedulación (Jacobs y Heyer, 2001).

Una vez sacrificados los anuros se realizó una disección de los organismos con el fin de extraer el hígado, siendo este un órgano donde se sintetizan metaloenzimas y donde se acumula mayor cantidad de metales (Jacobs y Heyer, 2001; Stoylar et al. 2008). Los hígados extraídos fueron colocados en una estufa eléctrica a 70°C durante 36 horas, para asegurar la deshidratación total de los hígados. Posterior al proceso de secado los órganos fueron macerados y se implementó la técnica de digestión ácida, la cual consiste en colocar 0.25g de la muestra en un matraz Kjeldahl al cual se le agregaron 10mL de ácido nítrico concentrado marca Fermont. Una vez mezclado el tejido con el ácido nítrico dentro del matraz se colocaron en una parrilla y se calentaron a ebullición hasta conseguir un volumen de 1 a 2mL. Una vez conseguido el volumen deseado se realizó un filtrado con papel filtro y se transfirió a un matraz para ser aforado a 50mL. Un total de 58 muestras de hígado de las cuatro especies de anuros seleccionadas (Cuadro 4) fueron analizadas por espectrofotometría de absorción atómica (Skoog et al. 2008) con un equipo marca GBC. Las muestras fueron analizadas en Laboratorio de Investigaciones Ambientales (LIA) del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos

**Cuadro 4.** Número de individuos por especie para el análisis de metales pesados.

| <b>Especie</b>             | <b>S1</b> | <b>S2</b> | <b>S3</b> | <b>S4</b> | <b>S5</b> | <b>Total</b> |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| <i>Rhinella horribilis</i> | 0         | 0         | 0         | 6         | 1         | 7            |
| <i>Lithobates zweifeli</i> | 6         | 5         | 1         | 5         | 3         | 20           |
| <i>L. spectabilis</i>      | 0         | 1         | 6         | 2         | 5         | 14           |
| <i>Smilisca baudinii</i>   | 0         | 2         | 8         | 0         | 7         | 17           |
| <b>Total</b>               | <b>6</b>  | <b>8</b>  | <b>15</b> | <b>13</b> | <b>16</b> | <b>58</b>    |

***Índice multi-metal de concentración (IMC) y bioacumulación relativa (IMBI)***

El índice multi-metal de concentración (IMC) y bioacumulación (IMBI), proporciona información de las concentraciones de metales en agua, sedimento y bioacumuladas en tejido, así como, la proporción de cada metal dentro de la mezcla de metales (Maes et al., 2005; Mussali-Galante et al., 2013). El IMC e IMBI se calcularon dividiendo la concentración individual del metal pesado  $i$  ( $C_i$ ) entre la concentración máxima observada ( $C_{i\text{total}}$ ) y promediando entre todos los metales. Estos índices toman valores de 0 a 1, donde: IMC-IMBI bajo  $< 0.22$  y IMC-IMBI alto  $> 0.25$ . De esta forma el índice de bioacumulación (multi-metal) se definió como:

$$IMC - IMBI = \frac{\sum_{i=1}^n C_i / C_{i\text{total}}}{n} \quad (2)$$

Dónde:

N=Número total de metales.

$C_i$ = Concentración individual del metal  $i$ .

$C_{i\text{total}}$ = Concentración total observada del metal  $i$ .

El IMBI se calculó para las concentraciones de metales bioacumulados por especie por sitio. El IMC se calculó para los metales de agua utilizando la misma ecuación. En el caso de los metales que no fueron detectados por el espectrofotómetro se utilizó el límite de detección del equipo para realizar el cálculo del índice.

***Muestreo de anuros***

Los muestreos de las comunidades de anuros se llevaron a cabo tanto en 2018 como en 2019. En la temporada de lluvias de 2018 en los meses de junio a septiembre, se realizaron cuatro salidas de campo con una duración de cinco días, en los que se tomaron los datos para describir la comunidad anuros en los sitios 2-5. En el mes de enero de 2019 se realizó un muestreo a los sitios de estudio 1-5 con la finalidad de tomar datos de anuros, previo a la pérdida de conectividad por falta de flujo de agua en el río; durante este muestreo no fue posible registrar anuros en los sitios. En los meses de junio y julio de 2019 se muestreó en los sitios 1-5 con la finalidad de aumentar el número de individuos y de especies de anuros.

En cada muestreo se implementó la técnica de relevamiento en zonas de reproducción de Scott y Woodward (2004). Para ello se tendieron seis transectos replicados por sitio (Crump y Scott, 2004). La longitud de los transectos fue de 20 metros por dos metros de ancho. La separación entre transectos fue de 50 metros para evitar el registro repetido de individuos en el mismo recorrido. Como técnica complementaria se realizaron caminatas aleatorias dentro de cada sitio con el objetivo de obtener el mayor número de especies e individuos posible (Crump y Scott, 2004). En todos los sitios de río los transectos fueron ubicados a lo largo de la corriente del río de forma aleatoria. Un total de 30 transectos por todos los sitios fueron muestreados durante cuatro noches por tres personas, en un horario de 20:00 a 24:00 horas, en temporada de lluvias 2018 y 2019.

Cada evento de colecta consistió en realizar caminatas lentas dentro de cada transecto, en las cuales fueron capturados los anuros observados en grietas, hojarasca, troncos, rocas y otros micro-hábitats donde es común encontrar anuros. Para la captura de los anuros adultos semi-acuáticos se ocupó la técnica de captura directa, empleando una red de golpeo. Para la captura de anuros adultos de especies de hábitos arborícolas y terrestres se realizó captura directa de tipo manual (Casas-Andreu et al., 1991). Los anuros capturados fueron separados en individuos adultos y juveniles siguiendo los criterios de Duellman y Trueb (1986) con base en la talla de los individuos. La identificación de los organismos se realizó con ayuda de las claves taxonómicas de Flores-Villela et al. (1995) y Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén (2010) siguiendo la actualización de Frost (2019).

De cada organismo adulto o juvenil observado se registró la especie, hora de captura, microhábitat donde fue observado cada organismo: agua, arena, rama, roca, suelo, materia orgánica (Feinsinger, 2001), transecto, sitio de muestreo, temperatura del sustrato, temperatura del organismo (°C), humedad relativa del sustrato con un Termohigrómetro marca UNI-T, sexo, peso (g) y la longitud hocico cloaca (mm). Las colectas fueron realizadas al amparo del permiso de colecta SGPA/DGVS/008320/18. Los individuos una vez que les fueron tomados los datos biométricos y del microhábitat, fueron liberados en el sitio donde fueron observados. Los ejemplares de *R. horribilis*, *L. spectabilis* y *S. baudinii* utilizados para el análisis de MP fueron fijados y depositados en la colección de herpetología en el museo de zoología “Alfonso Herrera” de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### ***Composición y Diversidad***

A partir de los datos obtenidos en campo de cada sitio del gradiente se llevaron a cabo los cálculos de diversos parámetros de la comunidad de anuros. Se calculó la riqueza total para la zona de estudio (número total de especies observadas) y por sitio (Moreno, 2001). Se calculó la abundancia total y relativa para las especies registradas en los sitios del gradiente en temporada de lluvias, con la siguiente ecuación:

$$Ar = Ni / Nt \times 100 \quad (3)$$

Dónde:

Ni= Número de individuos de cada especie.

Nt= Número total de individuos.

Para conocer la diversidad por sitio y para la zona de estudio se calculó el índice de diversidad de Shannon-Wiener. Este índice asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra. Además tiene fundamentos en la igualdad y desigualdad de los organismos, relacionando la riqueza y la abundancia relativa (Magurran, 1988).

$$H' = -\sum^s (pi) (\ln pi) \quad (4)$$

Dónde:

$\sum^s$ = Sumatoria de la abundancia relativa de la especie i.

ln pi= Logaritmo natural de la abundancia relativa de iésima especie.

El índice de diversidad de Simpson fue calculado para la diversidad de la zona de estudio en total, así como la de cada uno de los sitios del gradiente. Este índice toma en cuenta las especies que están mejor representadas (dominan) dentro de la comunidad, mostrando la probabilidad de que dos individuos muestreados al azar de una muestra correspondan a la misma especie. El valor de dominancia (D) se tomó como la sumatoria de la proporción de las especies para cada sitio (Simpson, 1949).

$$D' = 1 - \sum p_i^2 \quad (5)$$

Dónde:

$\sum p_i^2$  = Sumatoria de la proporción de la especie i.

El índice de equidad de Pielou (Villarreal et al., 2006) fue calculado para conocer la equidad de la comunidad de la zona de estudio y los sitios del gradiente. Dicho índice es una relación entre la diversidad observada y el máximo valor de diversidad esperado. Este índice toma valores entre 0 (cuando la abundancia de las especies no está representada por el mismo número de individuos) y 1 (cuando la abundancia de todas las especies es igual).

$$J' = H' / H'_{\max} \quad (6)$$

Dónde:

$H'_{\max} = \ln(S)$ .

$H'$  = Valor del índice de Shannon-Wiener.

El índice de similitud de Jaccard fue calculado para identificar la similitud en la composición de especies en los sitios de estudio. Este índice toma valores de 0 cuando no hay especies compartidas entre los sitios y 1 cuando los sitios poseen la misma composición de especies (Krebs, 1989; Moreno, 2001).

$$I_J = c / a + b - c \quad (7)$$

Dónde:

a= Número de especies presentes en el sitio A.

b= Número de especies presentes en el sitio B.

c= Número de especies presentes en ambos sitios A y B.

De igual forma fue calculado el índice de Sorensen para datos cuantitativos. Este índice de similitud, además de considerar la riqueza de especies entre sitios, considera también sus abundancias (Villarreal et al., 2004).

$$I_s = \frac{2pN}{aN + bN} \quad (8)$$

Dónde:

aN= número total de individuos en el sitio A

bN= número total de individuos en el sitio B

pN= sumatoria de la abundancia más baja de cada una de las especies compartidas entre ambos sitios.

Con el objetivo de observar los patrones de abundancia y composición de especies entre hábitats se elaboraron curvas de rango-abundancia (Feinsinger, 2001) donde se organizaron las especies de mayor a menor abundancia y fueron graficadas en escala logarítmica, con la intención de determinar cambios en los patrones de composición, riqueza, equidad y dominancia en el gradiente de contaminación.

### **Análisis estadísticos**

Los datos de las concentraciones de cada uno de los metales pesados en agua, sedimento e hígado, SSV, riqueza, abundancia, IMBI, IMC, fueron tratados inicialmente con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Esta prueba plantea como hipótesis nula que una muestra proviene de una población normalmente distribuida (Shapiro y Wilk, 1965), siendo una de las pruebas más potentes para hacer contrastes de normalidad. Los resultados de la prueba de Shapiro-Wilk, mostraron que los datos SSV, riqueza, abundancia, IMBI, IMC no poseían distribución normal. Para identificar diferencias en riqueza, abundancia, IMBI, IMC entre sitios, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual no asume normalidad ni homogeneidad de varianza en los datos (Kruskal y Wallis, 1952; Zar, 2010). Para identificar diferencias entre pares de muestras se realizó una prueba de múltiples comparaciones no paramétrica de Dunn (Dunn, 1964), siendo una prueba altamente eficiente para identificar los grupos diferentes, ya que utiliza el error estándar. Esta prueba a posteriori pondera el número de comparaciones y el tamaño de muestra, comparando la diferencia del rango ajustado con la diferencia del rango crítico. Si la diferencia es mayor a la diferencia mínima significativa se concluye que los tratamientos son estadísticamente significativos (Nuñez-Colín, 2018).

Los valores de IMBI de cada especie y de IMC para las matrices agua y sedimento al presentar distribución binomial fueron transformados en su arcoseno con la siguiente ecuación:  $\arcsin (\%)^{1/2}$  (Zar, 2010), posteriormente los valores IMBI e IMC fueron sometidos a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Para el caso de los metales que no fueron detectados en muestras de agua, sedimento e hígado, se utilizó la mitad del límite de detección y se transformó en su arcoseno para las comparaciones entre sitios. Los datos al no cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza fueron analizados con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para identificar diferencias entre pares de muestras de los valores IMBI e IMC se aplicó la prueba de múltiples comparaciones no paramétrica de Dunn (Dunn, 1964; Zar, 2010). Para analizar las diferencias en el IMBI de *Rhinella horribilis* se utilizó la prueba de U Mann-Whitney (Zar, 2010). Asimismo se utilizó una prueba de correlación no paramétrica de Spearman, para medir el grado de asociación entre dos variables cuantitativas (Zar, 2010). De esta forma se analizó el grado de asociación entre los valores de IMC de agua, sedimento. De igual forma los valores IMBI de *L. zweifeli* fueron correlacionados con los valores IMC de agua y sedimento, con el objetivo de identificar el grado de asociación entre los valores IMBI de *L. zweifeli* y los del IMC de agua y sedimento.

La riqueza y abundancia fueron analizados utilizando los datos de cada transecto, de esta forma se obtuvo una  $n=6$  por sitio. Los valores de riqueza y abundancia fueron sometidos a una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, posteriormente se analizaron con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, posteriormente se aplicó la prueba de múltiples comparaciones no paramétrica de Dunn (Dunn, 1964; Zar, 2010). Los análisis se realizaron con el software Statistica 8 (Statsoft, 2007). Los valores de los índices de diversidad de Shannon-Wiener y Simpson fueron comparados con una prueba delta ( $\delta$ ; Solow, 1993) en el programa Species Diversity and Richness 3.0.3. (Henderson y Seaby, 2002), dicha prueba permite describir la comunidad con base en el sesgo de cada índice hacia la equidad ( $H'$ ) y la dominancia ( $D'$ ) de especies en cada sitio.

## Resultados

### *Metales pesados contenidos en los cuerpos de agua de cada sitio de estudio*

En las muestras de agua del gradiente de contaminación por metales pesados, la concentración promedio mayor de Pb fue  $5.079 \text{ mg/L}^{-1}$  en el S5 y la menor  $2.628 \text{ mg/L}^{-1}$  en el S2. De forma general la concentración de Pb incrementó conforme a la cercanía al jal (Pb S5>S4>S3>S1>S2). La concentración promedio mayor de Cd fue  $0.108 \text{ mg/L}$  en el S5 y la menor  $0.081 \text{ mg/L}$  en el S3, no se detectó un patrón consistente (Cd S5>S2>S1>S4>S3) en la concentración de Cd conforme a la cercanía al jal. La concentración promedio mayor de Cu fue  $1.716 \text{ mg/L}$  en el S5 y la menor  $1.262 \text{ mg/L}$  en el S1, de forma general la concentración de Cu incrementó conforme a la cercanía al jal (Cu S5>S4>S3>S2>S1). La concentración promedio mayor de Mn fue  $0.424 \text{ mg/L}$  en el S5 y la menor  $0.000 \text{ mg/L}$  en el S2, no se observó un patrón de incremento (Mn S5>S4>S1>S3>S2) consistente en la concentración de Mn conforme a la cercanía al jal. La concentración promedio mayor de Zn fue  $0.159 \text{ mg/L}$  en el S4 y la menor  $0.038 \text{ mg/L}$  en el S2, no se observó un patrón consistente (Zn S4>S5>S3>S1>S2) en cuando a la cercanía al jal. De forma general la mayor concentración de Pb, Cu, Mn y Zn en agua se observó el S4 y S5, excepto el Cd donde el S5 y S3 tuvieron las concentraciones más elevadas. No se detectaron concentraciones de Fe y Cr en muestras de agua. Las concentraciones de Pb estuvieron por encima de los límites permisibles de la NOM-001-SEMARNAT-1996; el Cd, Cu, Mn y Zn estuvieron en concentraciones dentro del límite en todos los sitios (Cuadro 5).

### *Metales pesados asociados al sedimento en cada uno de los sitios de estudio*

En sedimento, la concentración promedio mayor de Fe fue  $234.18 \text{ mg/L}$  en el S2 y la menor  $126.47 \text{ mg/L}$  en el S4. Las concentraciones de Fe no mostraron un patrón de incremento (Fe S2>S5>S1>S3>S4) conforme a la cercanía al jal. La concentración promedio mayor de Cr fue  $1.96 \text{ mg/L}$  en el S3 y la menor  $1.00 \text{ mg/L}$  en el S5. Las concentraciones de Cr no mostraron un patrón de incremento (Cr S3>S2>S4>S1>S5) conforme a la cercanía al jal. La concentración promedio mayor de Mn fue  $1.61 \text{ mg/L}$  en el S5 y la menor concentración  $0.47 \text{ mg/L}$  en el S3. Las concentraciones de Mn no mostraron un patrón consistente (Mn

S5>S1>S4>S2>S3) conforme a la cercanía al jal. La concentración promedio mayor de Zn fue 5.97 mg/L en el S4 y la menor 1.73 mg/L en el S2. Las concentraciones de Zn no mostraron un patrón consistente (Zn S4>S1>S5>S3>S2) conforme a la distancia al jal. La concentración mayor promedio de Cu fue 0.37 mg/L en el S4 y la menor 0.06 mg/L en el S1 (Cu S4>S5>S; Cuadro 5). No fueron detectadas concentraciones de Cu en el S2 y S3, de igual forma no se detectaron concentraciones de Pb y Cd en los sitios de muestreo.

**Cuadro 5.** Concentraciones de metales pesados en agua (mg/L<sup>-1</sup>) y sedimentos (mg/Kg<sup>-1</sup>) de los sitios de muestreo en el gradiente de contaminación del río Huautla.

| <b>Metal</b><br><b>Sitio</b>                 | <b>Pb</b>  | <b>Cd</b>  | <b>Cu</b>  | <b>Cr</b> | <b>Mn</b>   | <b>Zn</b>  | <b>Fe</b>     |
|--|------------|------------|------------|-----------|-------------|------------|---------------|
| <b>S1</b>                                    |            |            |            |           |             |            |               |
| H <sub>2</sub> O <sub>(3)</sub> <sup>2</sup> | 2.92±0.48  | 0.09±0.03  | 1.26±0.22  | Nd        | 0.12±0.09   | 0.11±0.01  | Nd            |
| Sed <sub>(3)</sub>                           | Nd         | Nd         | 0.06±0.00  | 1.40±0.64 | 1.24±0.14   | 4.12±3.59  | 162.05±18.52  |
| <b>S2</b>                                    |            |            |            |           |             |            |               |
| H <sub>2</sub> O <sub>(3)</sub>              | 2.62±0.27  | 0.10±0.02  | 1.46±0.16  | Nd        | Nd          | 0.03±0.05  | Nd            |
| Sed <sub>(3)</sub>                           | Nd         | Nd         | Nd         | 1.92±0.06 | 0.53 ±0.11  | 1.73 ±1.13 | 234.18 ±27.85 |
| <b>S3</b>                                    |            |            |            |           |             |            |               |
| H <sub>2</sub> O <sub>(3)</sub>              | 3.36±0.37  | 0.08±0.01  | 1.49±0.06  | Nd        | 0.097±0.146 | 0.12 ±0.02 | Nd            |
| Sed <sub>(3)</sub>                           | Nd         | Nd         | Nd         | 1.96±0.12 | 0.47±0.33   | 3.21±3.86  | 143.01 ±32.43 |
| <b>S4</b>                                    |            |            |            |           |             |            |               |
| H <sub>2</sub> O <sub>(3)</sub>              | 4.38±0.47  | 0.08±0.01  | 1.67±0.06  | Nd        | 0.15 ±0.12  | 0.15 ±0.03 | Nd            |
| Sed <sub>(3)</sub>                           | Nd         | Nd         | 0.37 ±0.00 | 1.67±0.41 | 0.81±0.45   | 5.97±4.16  | 126.47 ±59.42 |
| <b>S5</b>                                    |            |            |            |           |             |            |               |
| H <sub>2</sub> O <sub>(3)</sub>              | 5.07 ±0.53 | 0.10 ±0.03 | 1.71 ±0.16 | Nd        | 0.42 ±0.06  | 0.12 ±0.02 | Nd            |
| Sed <sub>(3)</sub>                           | Nd         | Nd         | 0.16 ±0.14 | 1.00±0.09 | 1.61 ±0.20  | 3.68±2.91  | 198.15 ±31.02 |

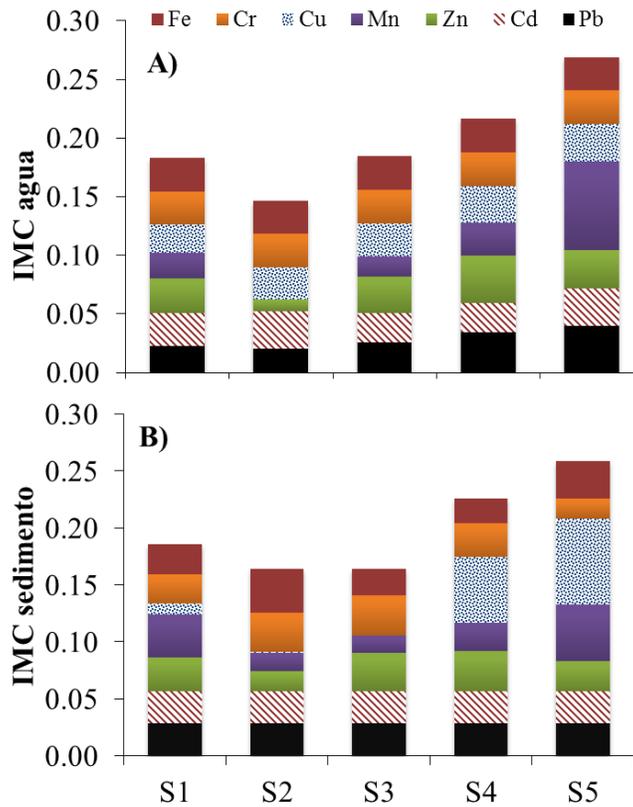
Abreviaturas indican: S1) sitio 1; S2) sitio 2; S3) sitio 3; S4) sitio 4; S5) sitio 5; Mn) Manganeso; Cr) Cromo; Cd) Cadmio; Fe) Hierro; Cu) Cobre; Pb) Plomo; Zn) Zinc; Nd) No detectado; L.D) Límite de detección; H<sub>2</sub>O) agua; Sed) sedimento; ND) No detectado. <sup>2</sup>Número de muestras.

**Sólidos volátiles suspendidos en sedimento (SVS)**

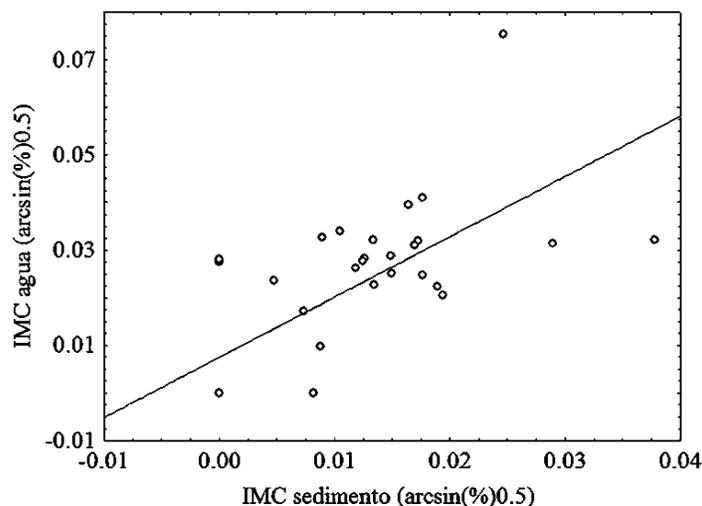
Las concentraciones de SVS en los sedimentos de los sitios de muestreo dentro de la cuenca del río Huautla indican que las concentraciones fueron de 2.0 a 7.5 mg/Kg<sup>-1</sup>. Las mayores concentraciones se detectaron en los sitios S1 (3.2 mg/Kg<sup>-1</sup>), S2 (3.0 mg/Kg<sup>-1</sup>) y S3 (7.5 mg/Kg<sup>-1</sup>) corriente arriba del sitio donde se ubica el jal. Las menores concentraciones de SVS se detectaron en el sitio donde se ubica el jal S4 (2.0 mg/Kg-1) y S5 (2.0 mg/Kg-1). Estos resultados permiten identificar la presencia de un patrón consistente (S3>S1>S2>S5>S4) en la cantidad de SVS en los sedimentos del río Huautla, donde las concentraciones más altas se presentan corriente arriba del jal y las menores en el sitio del jal y corriente debajo de este residuo minero.

**Índice multi-metal de concentración en agua y sedimento (IMC)**

Los resultados del IMC indican que en el agua existen valores IMC de 0.18 a 0.27. En los S1 (0.18), S2 (0.15) y S3 (0.18) los valores IMC del agua son bajos de acuerdo con la escala del índice. Los resultados observados para el S4 (0.22) muestran un valor bajo para este índice en el agua. El S5 (0.27) corriente abajo del jal presentó un valor IMC alto para la mezcla de metales contenidos en el agua. Los resultados para el IMC en sedimentos fueron de 0.16 a 0.26. En los S1 (0.19), S2 (0.16) y S3 (0.16) los valores IMC de los sedimentos fueron bajos de acuerdo con la escala del índice. Los resultados del S4 (0.23) donde se encuentra ubicado el jal presentan un valor bajo de IMC de acuerdo con la escala del índice. El S5 (0.26) corriente abajo del sitio donde se única el jal, presentó un valor IMC alto de acuerdo con la escala de este índice. Las matrices agua y sedimento compartieron el mismo patrón (S2>S3>S1>S4>S5) en los valores IMC de la mezcla contenida de metales pesados, evidencia de la presencia de un gradiente de contaminación por metales pesados en la cuenca del río Huautla. No se observaron diferencias significativas de los valores IMC de agua ( $H_{(4,35)}= 8.46; P=0.07$ , Figura 4A) y sedimentos ( $H_{(4,35)}= 2.07; P=0.72$ ; Figura 4B) entre sitios. La correlación de Spearman indica que existe correlación positiva y significativa entre IMC de agua y sedimentos ( $r_s= 0.70; P<0.05$ ; Figura 5) del río Huautla.



**Figura 4.** Índice de concentración multi-metal IMC en: A) agua y B) sedimentos del gradiente de contaminación del río Huautla. Se muestra el IMC calculado en los sitios expuestos al jal y no expuestos al jal. Las abreviaturas indican: S1) sitio 1, S2) sitio 2; S3) sitio 3; S4) sitio 4; S5) sitio 5.



**Figura 5.** Correlación el índice multimetal de concentración (IMC) de agua y sedimentos. En el eje Y se muestran los valores de IMC para agua y en el eje X los valores IMC en sedimentos del río Huautla.

**Bioacumulación de metales pesados en el hígado de *Smilisca baudinii***

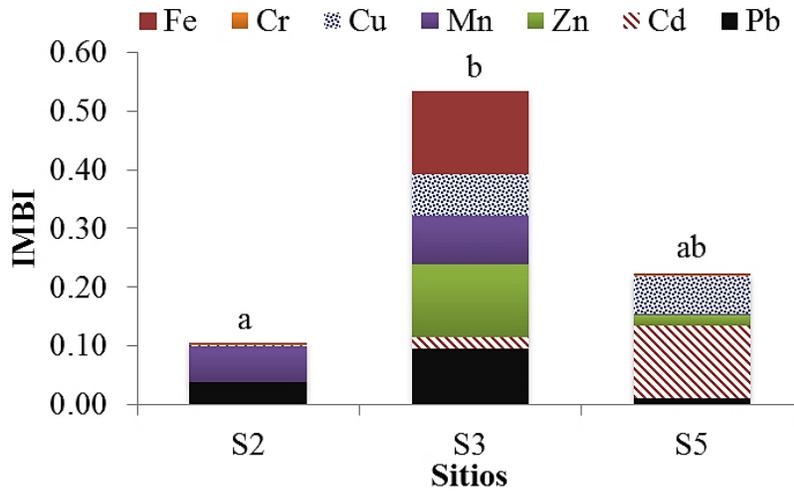
En *S. baudinii*, la bioacumulación promedio de Pb fue de 0.13 a 3.14 mg/Kg<sup>-1</sup>; la de Zn de 0.22 a 6.81 mg/Kg<sup>-1</sup>; las de Cu de 0.21 a 0.31 mg/Kg<sup>-1</sup>; Mn 0.19 a 0.28 mg/Kg<sup>-1</sup>; las de Fe 1.43 a 22.71 mg/Kg<sup>-1</sup>; las de Cd de 0.02 a 0.03 mg/Kg<sup>-1</sup> (Cuadro 6. **Promedio y desviación estándar para Plomo, Zinc, Manganeso, Hierro, Cadmio y Cobre bioacumulados (mg/Kg-1) en el hígado de *S. baudinii* por sitio de muestreo en la cuenca del río Huautla.**). Se observó un patrón consistente para Pb y Mn (S2>S3>S5), donde el S2 corriente arriba del jal tuvo las concentraciones más altas para ambos metales y las más bajas en el sitio S5 corriente abajo del jal. Otro patrón consistente se observó para Cu y Cd (S5>S3>S2), donde las mayores concentraciones siempre se registraron en el S5 corriente abajo del jal y las menores en el S2 corriente arriba del jal. El Fe (S3>S5>S2) y Zn (S3>S5>S2) no mostraron un patrón consisten en la bioacumulación por sitio.

El índice de bioacumulación relativa calculado para *S. baudinii* mostró valores bajos para los sitios S2 (IMBI= 0.10) y S5 (IMBI= 0.22), pero altos para el sitio S3 (IMBI= 0.53). Se observaron diferencias significativas de Kruskal-Wallis ( $H_{(2, 21)}=7.23, P=0.02$ ; Figura 6) entre los valores de IMBI del S2 y S3. No existieron diferencias significativas entre el valor IMBI del S5, en comparación con los valores IMBI del S2 y S3.

**Cuadro 6.** Promedio y desviación estándar para Plomo, Zinc, Manganeso, Hierro, Cadmio y Cobre bioacumulados (mg/Kg<sup>-1</sup>) en el hígado de *S. baudinii* por sitio de muestreo en la cuenca del río Huautla.

| Sitio      | Pb          | Zn            | Cu            | Mn           | Fe           | Cd           | Cr |
|------------|-------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|----|
| S2         | 3.14±0.89   | 0.22±0.01     | 0.21±0.02     | 0.28±0.02    | 1.43±0.24    | Nd           | Nd |
| S3         | 0.99±1.76   | 6.81±8.15     | 0.29±0.21     | 0.19±0.04    | 22.71±13.96  | 0.02±0.00    | Nd |
| S5         | 0.13±0.10   | 1.32±1.22     | 0.31±0.10     | Nd           | Nd           | 0.03±0.01    | Nd |
| <b>L.D</b> | <b>0.01</b> | <b>0.0004</b> | <b>0.0015</b> | <b>0.005</b> | <b>0.003</b> | <b>0.001</b> |    |

Abreviaturas indican: S2) sitio 2; S3) sitio 3; sitio 5 S5); Mn) Manganeso; Cr) Cromo; Cd) Cadmio; Fe) Hierro; Cu) Cobre; Pb) Plomo; Zn) Zinc; Nd) No detectado, L.D) Límite de detección.



**Figura 6.** Índice de bioacumulación relativa de *S. baudinii*. Se muestra la mezcla de metales por sitio y la proporción de cada metal dentro de la muestra. Abreviaturas indican: S2) sitio 2; S3) sitio 3; sitio 5 S5); Mn) Manganeso; Cr) Cromo; Cd) Cadmio; Fe) Hierro; Cu) Cobre; Pb) Plomo; Zn) Zinc. Letras indican diferencias significativas de la prueba de múltiples comparaciones de Dunn.

**Bioacumulación de metales en el hígado de *Lithobates zweifeli***

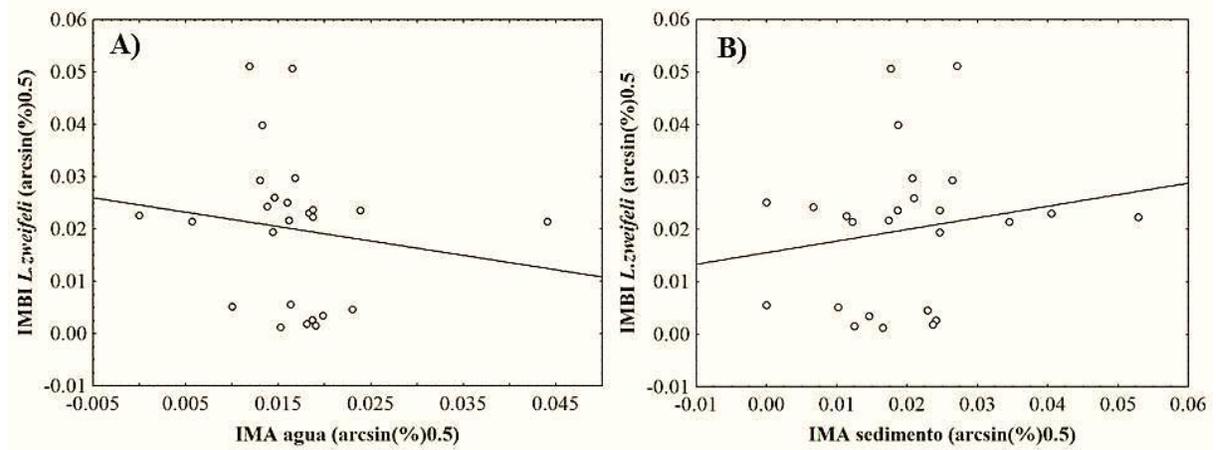
En *L. zweifeli* la bioacumulación promedio de Pb fue de 0.03 a 0.18 mg/Kg<sup>-1</sup>; la de Zn de 0.44 a 6.68 mg/Kg<sup>-1</sup>; la de Cu de 0.11 a 0.49 mg/Kg<sup>-1</sup>; la de Fe de 20.36 a 33.54 mg/Kg<sup>-1</sup>; la de Cd 0.01 a 0.02 mg/Kg<sup>-1</sup>; no se detectaron concentraciones de Cr y Mn (Cuadro 7). Se observó un patrón consistente para Fe y Cu (S1>S4>S2>S5>S3), donde las mayores concentraciones siempre se registraron en el S1 corriente arriba del jal. El Pb (S3>S1>S4>S5>S2), Cd (S2>S4>S1>S5>S3) y Zn (S1>S2>S4>S5>S3) no mostraron un patrón consisten en la bioacumulación por sitio.

**Cuadro 7.** Promedio y desviación estándar de Plomo, Zinc, Manganeso, Hierro, Cadmio y Cobre bioacumulados (mg/Kg<sup>-1</sup>) en el hígado de *L. zweifeli* por sitio de muestreo en la cuenca del río Huautla.

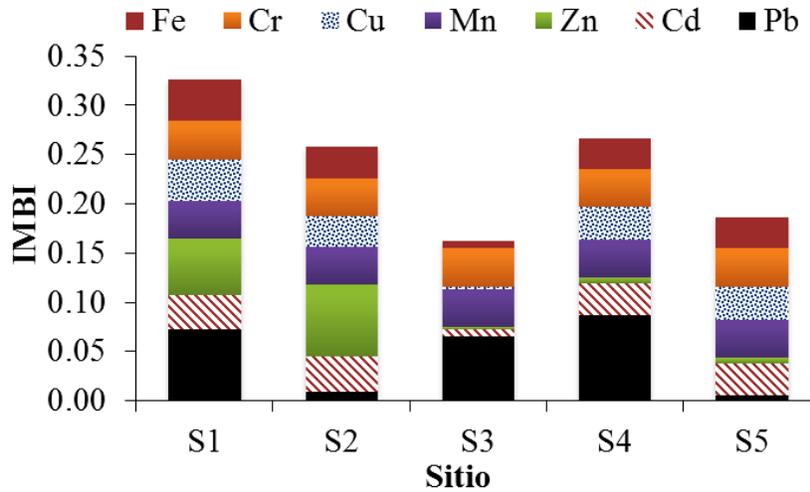
| Sitio      | Pb          | Zn            | Cu            | Fe           | Cd           | Cr           | Mn           |
|------------|-------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| S1         | 0.08±0.03   | 4.43±3.47     | 0.31±0.16     | 22.93±9.17   | 0.01±0.003   | Nd           | Nd           |
| S2         | 0.005±0.00  | 6.68±8.54     | 0.33±0.12     | 21.18±9.09   | 0.01±0.003   | Nd           | Nd           |
| S3         | 0.18±0.01   | 0.81±0.003    | 0.11±0.004    | 24.26±0.11   | 0.02±0.004   | Nd           | Nd           |
| S4         | 0.03±0.02   | 0.44±0.10     | 0.29±0.19     | 20.36±10.70  | 0.01±0.007   | Nd           | Nd           |
| S5         | 0.005±0.00  | 0.99±0.20     | 0.49±0.20     | 33.54±6.64   | 0.02±0.02    | Nd           | Nd           |
| <b>L.D</b> | <b>0.01</b> | <b>0.0004</b> | <b>0.0015</b> | <b>0.003</b> | <b>0.001</b> | <b>0.003</b> | <b>0.005</b> |

Abreviaturas indican: S2) sitio 2; S3) sitio 3; sitio 5 S5); Mn) Manganeso; Cr) Cromo; Cd) Cadmio; Fe) Hierro; Cu) Cobre; Pb) Plomo; Zn) Zinc; Nd) No detectado; L.D) Límite de detección.

La resultados obtenidos de la correlación de Spearman indican que existe correlación negativa y significativa entre los valores de bioacumulación de IMBI en *L. zweifeli* y los valores de acumulación del IMC en el agua ( $r_s = 0.48$ ;  $P < 0.05$ ; Figura 7) y correlación positiva y significativa con los valores IMA del sedimento ( $r_s = 0.67$ ;  $P < 0.05$ ; Figura 7B) de los sitios de muestreo. El índice de bioacumulación relativa en *L. zweifeli* obtuvo valores bajos para los sitios S3, S4 y S5 pero altos para los sitios S1 y S2. No se observaron diferencias significativas ( $H_{(4, 35)} = 7.82$ ;  $P = 0.09$ ; Figura 8) entre el valor de IMBI de los sitios de muestreo.



**Figura 7.** Correlación de Spearman para los valores de IMBI en *L. zweifeli* y los valores IMC en las matrices ambientales A) agua y B) sedimento. En el eje X se muestran los valores IMC de agua y sedimento. En el eje Y se muestran los valores IMBI de *L. zweifeli*.



**Figura 8.** Índice de bioacumulación relativa en *L. zweifeli*. Se muestra la mezcla de metales por sitio y la proporción de cada metal dentro de la muestra. S1) sitio 1; S2) sitio 2; S3) sitio 3; S4) sitio 4; sitio; S5) sitio 5; Mn) Manganeso; Cr) Cromo; Cd) Cadmio; Fe) Hierro; Cu) Cobre; Pb) Plomo; Zn) Zinc.

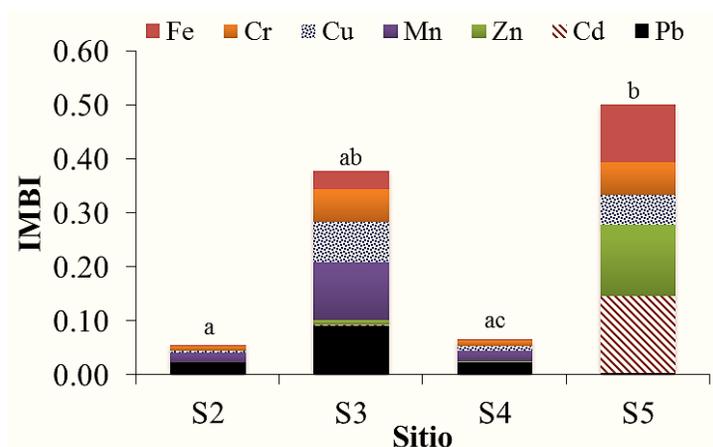
**Bioacumulación de metales pesados en *Lithobates spectabilis***

En *L. spectabilis*, la bioacumulación promedio de Pb fue de 0.15 a 4.00 mg/Kg<sup>-1</sup>; la de Zn de 0.48 a 7.46 mg/Kg<sup>-1</sup>; la de Cu de 0.13 a 0.42 mg/Kg<sup>-1</sup>; la de Mn de 0.19 a 0.24 mg/Kg<sup>-1</sup>; la de Fe de 1.63 a 31.15 mg/Kg<sup>-1</sup>; la de Cd de 0.02 a 0.03 mg/Kg<sup>-1</sup> (Cuadro 8). Se observó un patrón consistente para Pb, Cu y Mn (S3>S5>S4>S2), donde las mayores concentraciones siempre se registraron en el S3 corriente arriba del jal y S5 corriente abajo del jal. El Zn y Fe (S3>S5>S4>S2) mostraron un patrón consistente en la bioacumulación por sitio, donde la mayor concentración de dichos metales siempre fue mayor en el S5 corriente abajo del jal y S3 corriente arriba del jal. No se detectaron concentraciones de Cd y Cr bioacumuladas en el hígado de *L. spectabilis* (Cuadro 8). El índice de bioacumulación relativa en *L. spectabilis* obtuvo valores bajos para los sitios S2 y S4, pero altos para los S3 y S5. Se observaron diferencias significativas de Kruskal- Wallis ( $H_{(3,28)} = 8.24; P = 0.02$ ; Figura 9) de los valores IMBI de *L. spectabilis* entre sitios.

**Cuadro 8.** Promedio y desviación estándar de Plomo, Zinc, Manganeso, Hierro, Cadmio y Cobre bioacumulados (mg/Kg<sup>-1</sup>) en el hígado de *L. spectabilis* por sitio de muestreo en la cuenca del río Huautla.

| Sitio      | Pb          | Zn            | Cu            | Mn           | Fe           | Cd           |
|------------|-------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| S2         | 3.83±0.60   | 0.31±0.01     | 0.13±0.01     | 0.19±0.01    | 1.63±0.19    | 0.0004       |
| S3         | 2.55±1.58   | 0.57±0.22     | 0.42±0.15     | 0.24±0.13    | 8.10±14.12   | 0.02±0.00    |
| S4         | 4.00±0.25   | 0.48±0.30     | 0.28±0.01     | 0.23±0.01    | 2.46±0.228   | 0.0004       |
| S5         | 0.15±0.05   | 7.46±7.52     | 0.373±0.32    | 0.0015       | 31.150±3.33  | 0.031±0.01   |
| <b>L.D</b> | <b>0.01</b> | <b>0.0004</b> | <b>0.0015</b> | <b>0.005</b> | <b>0.003</b> | <b>0.001</b> |

Abreviaturas indican: S2) sitio 2; S3) sitio 3; sitio 5 S5); Mn) Manganeso; Cr) Cromo; Cd) Cadmio; Fe) Hierro; Cu) Cobre; Pb) Plomo; Zn) Zinc; Nd) No detectado; L.D) Límite de detección.



**Figura 9.** Índice de bioacumulación relativa de *L. spectabilis*. Se muestra la mezcla de metales por sitio y la proporción de cada metal dentro de la muestra. Abreviaturas indican: S2) sitio 2; S3) sitio 3; S4) sitio 4; sitio 5 S5); Mn) Manganeso; Cr) Cromo; Cd) Cadmio; Fe) Hierro; Cu) Cobre; Pb) Plomo; Zn) Zinc. Letras indican diferencias significativas de la prueba de múltiples comparaciones de Dunn.

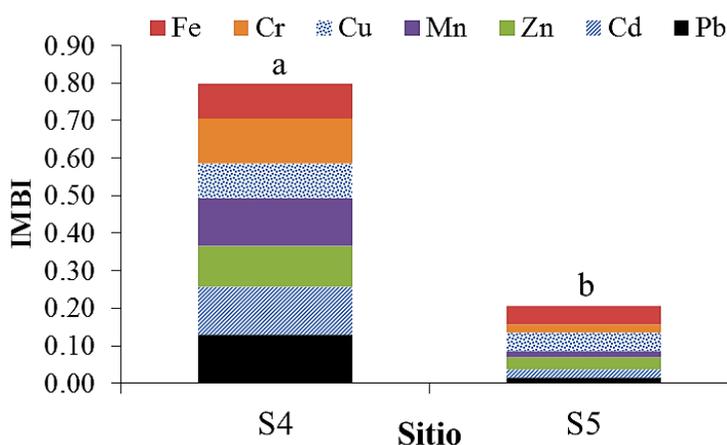
**Bioacumulación de metales en *Rhinella horribilis***

En *R. horribilis* la bioacumulación promedio de Pb fue de 2.86 a 4.06 mg/Kg<sup>-1</sup>; la de Zn de 0.41 a 4.43 mg/Kg<sup>-1</sup>; la de Cu de 0.41 a 1.39 mg/Kg<sup>-1</sup>; la de Mn 0.15 a 0.21 mg/Kg<sup>-1</sup>; la de Fe 2.03 a 22.93 mg/Kg<sup>-1</sup>. No se detectaron concentraciones de Cr y Cd (Cuadro 9). El patrón identificado en el S4 (Pb>Fe>Cu>Zn>Mn) indica que el Pb presentó la mayor concentración promedio en el S4, contrario a lo observado de acuerdo al patrón observado en el S5 (Fe>Pb>Cu>Zn>Mn), donde la mayor concentración promedio la registró el Fe y de forma general el resto de metales fueron mayores a las del S4, aunque el patrón de Cu, Zn y Mn es similar en el S4 y S5. El índice de bioacumulación relativa en *R. horribilis* mostró un valor bajo para el S5, pero un valor alto para el S4 de acuerdo con la escala de este índice. Se observaron diferencias significativas de la prueba de U Mann-Whitney (U<sub>MW</sub>= 3.13; P<0.001; Figura 10) entre el valor de IMBI del S4 y S5.

**Cuadro 9.** Promedio y desviación estándar de Plomo, Zinc, Manganeso, Hierro, Cadmio y Cobre bioacumulados (mg/Kg<sup>-1</sup>) en el hígado de *R. horribilis* por sitio de muestreo en la cuenca del río Huautla.

| Sitio      | Pb          | Zn            | Cu            | Mn           | Fe           | Cd           | Cr           |
|------------|-------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| S4         | 4.06±0.86   | 0.41±0.13     | 0.41±0.21     | 0.21±0.11    | 2.03±0.42    | Nd           | Nd           |
| S5         | 2.86±0.12   | 0.71±0.02     | 1.39±0.06     | 0.15±0.02    | 6.55±0.35    | Nd           | Nd           |
| <b>L.D</b> | <b>0.01</b> | <b>0.0004</b> | <b>0.0015</b> | <b>0.005</b> | <b>0.003</b> | <b>0.001</b> | <b>0.003</b> |

Abreviaturas indican: S2) sitio 2; S3) sitio 3; sitio 5 S5); Mn) Manganeso; Cr) Cromo; Cd) Cadmio; Fe) Hierro; Cu) Cobre; Pb) Plomo; Zn) Zinc; Nd) No detectado; L.D) Límite de detección.



**Figura 10.** Índice de bioacumulación relativa de *R. horribilis*. Se muestra la mezcla de metales por sitio y la proporción de cada metal dentro de la muestra. Abreviaturas indican: S4) sitio 4; sitio 5; S5); Mn) Manganeso; Cr) Cromo; Cd) Cadmio; Fe) Hierro; Cu) Cobre; Pb) Plomo; Zn) Zinc. Letras indican diferencias significativas de la prueba de U Mann-Whitney.

**Muestreo de anuros**

Se capturaron un total de 199 individuos a lo largo del gradiente de contaminación por MP las cuales pertenecieron a nueve especies, distribuidas en ocho géneros y cinco familias de anuros (Cuadro 10) después de 260 horas de esfuerzo de muestreo en las temporadas de lluvias de 2018 (131.2 horas) y 2019 (128.4 horas). No se lograron capturas en visitas a los sitios en el mes de enero de 2019. La tasa de captura total por persona fue de 0.77 individuos/hora. La mayor tasa de captura de la temporada 2018 se registró en el S4 (1.17 individuos/hora) y S5 (0.91 individuos/hora). La menor tasa de captura de la temporada 2018 se registró en el S2 (0.34 individuos/hora) y S3 (0.67 individuos/hora). La mayor tasa de captura para la temporada 2019 se registró en el S1 (1.18 individuos/hora), S4 (0.84 individuos/hora) y S5 (0.70 individuos/hora). La menor tasa de captura para la temporada 2019 se registró en el S2 (0.49 individuos/hora) y S3 (0.52 individuos/hora). La mayor tasa de captura para la temporada 2018 y 2019 se registró en los sitios S1 (1.18 individuos/hora), S4 (1.04 individuos/hora) y S5 (0.83 individuos/hora). La menor tasa de captura para la temporada 2018 y 2019 se registró en los sitios S2 (0.40 individuos/hora) y S3 (0.59 individuos/hora). Líneas abajo se describen los patrones de riqueza, abundancia y diversidad para el estudio. De las especies capturadas, ninguna se encuentra alguna categoría de riesgo según la NOM-059-SEMARNAT-2010. La IUCN tiene en categoría en peligro (EN) a *Incilius perplexus*, el resto de especies están en la categoría de preocupación menor (LC). Los grupos funcionales de anuros identificados fueron Terrestre, Semiacuático, Arborícola y Saxícola.

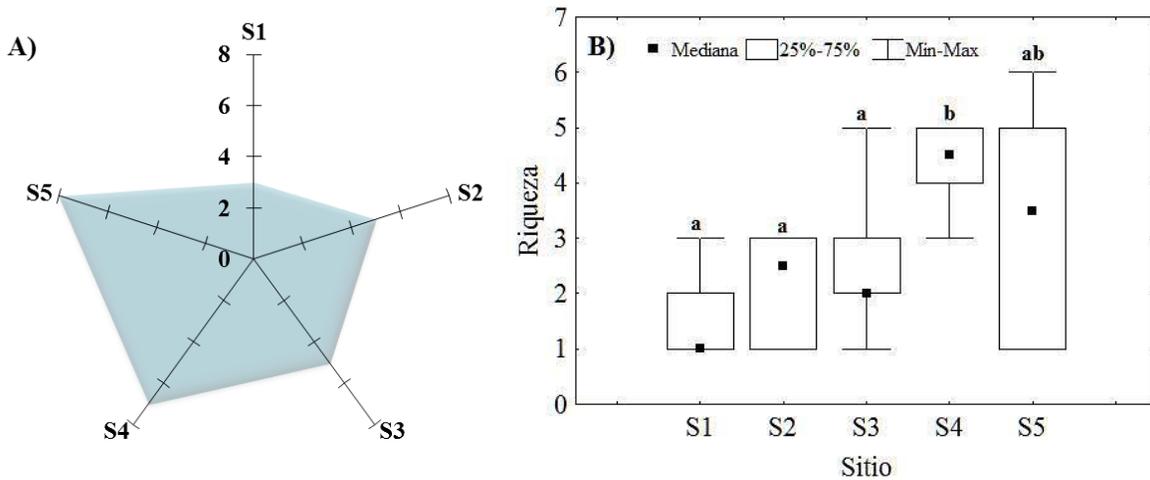
**Cuadro 10.** Especies de anuros en los sitios de muestreo del río Huautla. Se indica la riqueza y abundancia de anuros total y por sitio de muestreo. El cuadro incluye datos de 2018 y 2019.

| Familia                | Especie                                       | S1        | S2        | S3        | S4        | S5        | Total      | IUCN |
|------------------------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------|
| <i>Bufonidae</i>       | <i>Incilius perplexus</i> <sub>(t)</sub>      | 0         | 0         | 3         | 7         | 6         | 16         | EN   |
|                        | <i>Rhinella horribilis</i> <sub>(t)</sub>     | 2         | 1         | 2         | 21        | 7         | 33         | LC   |
| <i>Hylidae</i>         | <i>Smilisca baudinii</i> <sub>(a)</sub>       | 0         | 7         | 6         | 3         | 15        | 31         | LC   |
|                        | <i>Tlalocohyla smithii</i> <sub>(a)</sub>     | 0         | 0         | 0         | 0         | 9         | 9          | LC   |
|                        | <i>Dryophytes arenicolor</i> <sub>(s)</sub>   | 1         | 2         | 0         | 6         | 1         | 10         | LC   |
| <i>Microhylidae</i>    | <i>Hypopachus variolosus</i> <sub>(t)</sub>   | 0         | 0         | 0         | 2         | 0         | 2          | LC   |
| <i>Phyllomedusidae</i> | <i>Agalychnis dacnicolor</i> <sub>(a)</sub>   | 0         | 0         | 0         | 0         | 2         | 2          | LC   |
| <i>Ranidae</i>         | <i>Lithobates spectabilis</i> <sub>(sa)</sub> | 0         | 1         | 13        | 3         | 5         | 22         | LC   |
|                        | <i>Lithobates zweifeli</i> <sub>(sa)</sub>    | 36        | 15        | 2         | 11        | 10        | 74         | LC   |
| <b>Abundancia</b>      |   | <b>39</b> | <b>26</b> | <b>26</b> | <b>53</b> | <b>55</b> | <b>199</b> |      |
| <b>Riqueza</b>         |   | <b>3</b>  | <b>5</b>  | <b>5</b>  | <b>7</b>  | <b>8</b>  | <b>9</b>   |      |

Las abreviaturas indican: S1) sitio 1; S2) sitio 2; S3) sitio 3; S4) sitio 4; S5) sitio 5; EN) en peligro; LC) preocupación menor; a) arborícola; t) terrestre; s) saxícola; sa) semi-acuático. Se muestra la familia a la que pertenecen las especies de anuros registradas.

**Riqueza de anuros**

Los resultados de riqueza entre sitios mostraron el siguiente patrón: S4>S5>S3>S2>S1. Tomando en consideración ambos años de muestreo por sitio, los valores de riqueza más altos fueron registrados en el S4 (S=8) el sitio donde se encuentra el jal y S5 (S=7) corriente abajo del jal. Los valores de riqueza más bajos se observaron en el S1 (S=3), S2 (S=5) y S3 (S=5) corriente arriba del sitio donde se ubica el jal (Figura 11A). Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis indican que existen diferencias estadísticamente significativas ( $H_{(4,30)} = 11.568 P = 0.029$ ; Figura 11B) entre los valores de riqueza de los S1, S2, S3 en contraste con el valor de riqueza del S4. El S5 no mostró diferencias en los valores de riqueza con los S1, S2, S3 y S4.



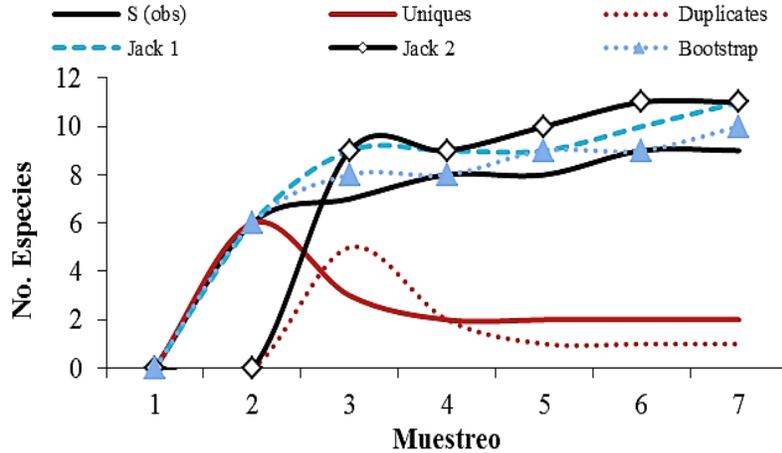
**Figura 11.** Riqueza total por sitio de muestreo dentro de cuenca del río Huautla. A) Riqueza total por sitio, B) Comparación de la riqueza por sitio de muestreo en la cuenca del río Huautla. Letras denotan diferencias significativas de la prueba de múltiples comparaciones de Dunn. Se muestra la mediana, rangos intercuartiles y valores mínimos y máximos por sitio.

**Estimación de la riqueza de especies**

Con base en los estimadores de riqueza Jackknife 1 y 2, la riqueza observada en campo representó el 82% de la riqueza estimada para toda la zona de estudio (todos los sitios y eventos de colecta en conjunto; Figura 12). Se esperaría encontrar 2 especies de anuros adicionalmente para completar el inventario de especies. La estimación Bootstrap sugiere que la riqueza observada es del 90% (10 especies; Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Riqueza observada y estimada por cada estimador empleado para la comunidad de anfibios del río Huautla. Se muestra la representatividad del muestreo en función del número observado de especies comparado entre el estimado y se representa en porcentaje

|                    | Riqueza estimada | Representatividad % |
|--------------------|------------------|---------------------|
| <b>S (obs)</b>     | <b>9</b>         | <b>-</b>            |
| <b>Jackknife1</b>  | <b>11</b>        | <b>82</b>           |
| <b>Jackknife 2</b> | <b>11</b>        | <b>82</b>           |
| <b>Bootstrap</b>   | <b>10</b>        | <b>90</b>           |



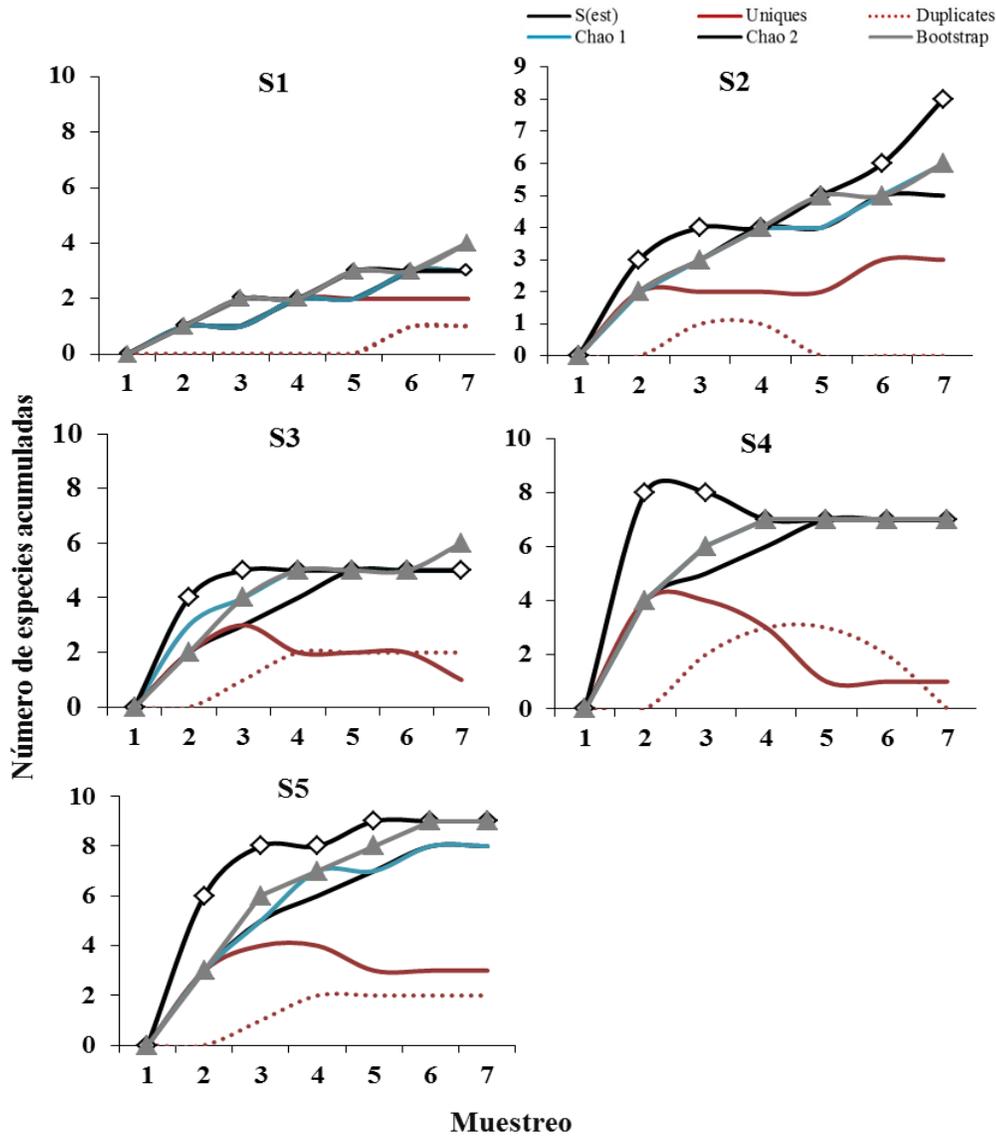
**Figura 12.** Curvas de acumulación de especies de anuros para el ejido Huautla. En la parte superior se muestran las líneas de los estimadores utilizados. En el eje y se muestra el número de especies acumuladas. En el eje x se muestra el número de muestreos.

**Estimación de la riqueza por sitio**

La riqueza observada representó entre el 63 y el 100% de la riqueza estimada. Al hacer el análisis por sitios, el estimador Chao 1 predijo una riqueza similar a la observada en los sitios S1, S3, S4 y S5. El estimador Chao 2 predijo una riqueza similar a la observada en los sitios S1, S3 y S4. El estimador Bootstrap predijo una riqueza similar a la observada en el sitio S4. Las curvas de acumulación de especies para el S2, S4 y S5 alcanzaron la asíntota y para el S1 y S3 las curvas de acumulación no alcanzan la asíntota (Cuadro 12; Figura 13).

**Cuadro 12.** Riqueza observada y estimada por sitio de muestreo. Las abreviaturas indican: S1) sitio 1; S2) sitio 2; S3) sitio 3; S4) sitio 4; S5) sitio 5. Se muestra la representatividad del muestreo en función del número observado de especies por sitio entre el estimado y se representa en porcentaje.

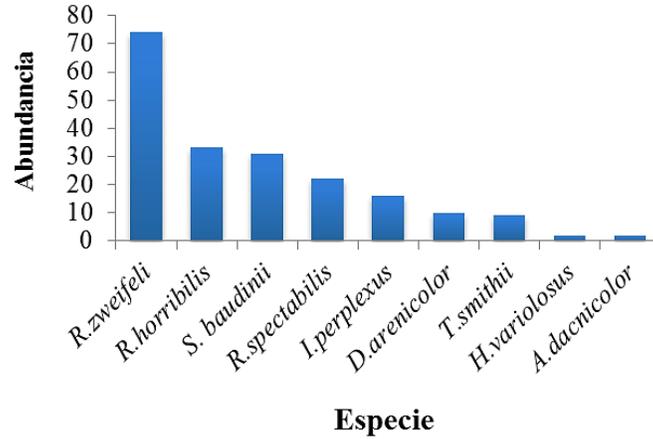
|                    | S1       | S2       | S3       | S4       | S5       |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>S(obs)</b>      | <b>3</b> | <b>5</b> | <b>5</b> | <b>7</b> | <b>8</b> |
| <b>Chao 1</b>      | 3        | 6        | 5        | 7        | 8        |
| Representatividad% | 100      | 83       | 100      | 100      | 100      |
| <b>Chao 2</b>      | 3        | 8        | 5        | 7        | 9        |
| Representatividad% | 100      | 63       | 100      | 100      | 89       |
| <b>Bootstrap</b>   | 4        | 6        | 6        | 7        | 9        |
| Representatividad% | 75       | 83       | 83       | 100      | 89       |



**Figura 13.** Curvas de acumulación de especies por sitio de muestreo. En el eje x se muestra el número de muestreo. En el eje Y se muestra el número de especies acumuladas por sitio.

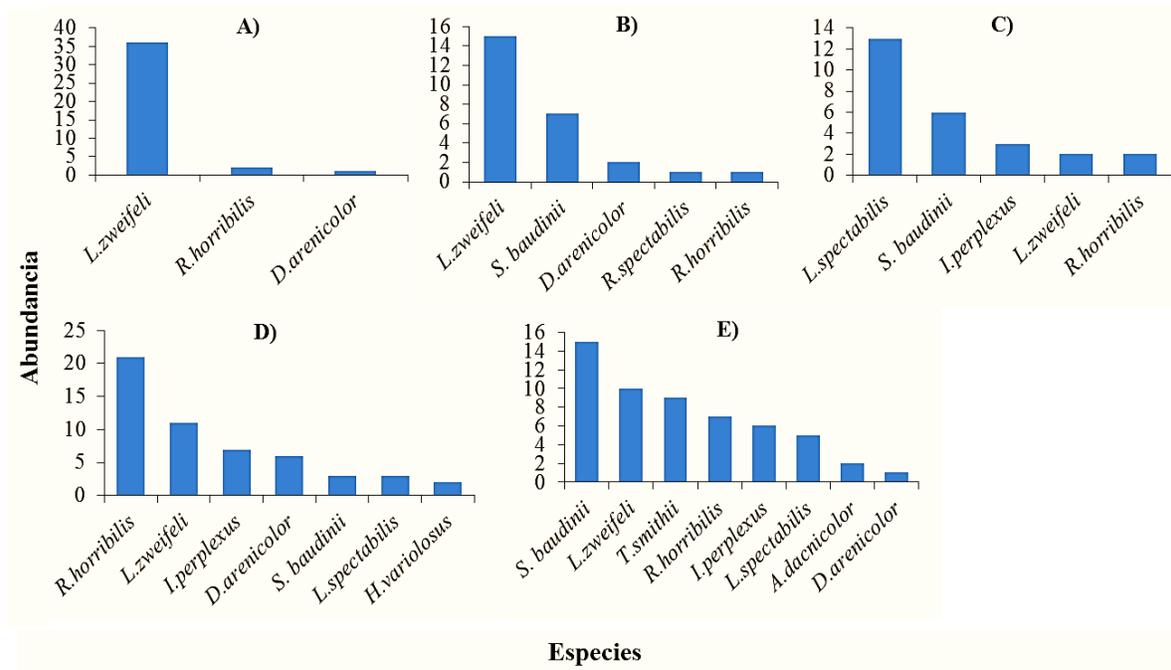
**Abundancia de anuros en los sitios de muestreo del gradiente de contaminación**

Los resultados de abundancia indican que existen distintos valores de abundancia para las especies de anuros identificadas en este trabajo (Figura 14). Las especies que presentaron la mayor abundancia dentro de los sitios fueron *L. zweifeli* (n=74), *R. horribilis* (n=33), *S. baudinii* (n=31), *R. spectabilis* (n=22), *I. perplexus* (n=16), *D. arenicolor* (n=10) y *T. smithii* (n= 9). Las especies de anuros que presentaron los valores de abundancia más bajos fueron *H. variolus* (n=2) y *A. dacnicolor* (n=2).



**Figura 14.** Abundancia total de las especies de anuros reportadas para la cuenca del río Huautla.

Considerando todos los eventos de colecta en el S1 la especie más abundante fue *R. zweifeli* y la especie con menor abundancia *D. arenicolor* (Figura 15A). En el S2 (Figura 15B) las especies más abundantes fueron *L. zweifeli*, *S. baudinii* y las menos abundantes *R. spectabilis* y *R. horribilis*. Las especies más abundantes en el S3 (Figura 15C) fueron *L. spectabilis* y *S. baudinii*; las menos abundantes *L. zweifeli* y *R. horribilis*. Para el S4 (Figura 15D) la especie más abundante fue *R. horribilis*, *L. zweifeli* y las menos abundantes *H. variolosus*. La mayor abundancia en el S5 (Figura 15E) la presentó *T. smithii* y la menor abundancia *D. arenicolor*. No existieron diferencias significativas entre los valores de abundancia de los sitios ( $H_{(4,30)} = 6.99$   $P = 0.13$ ).



**Figura 15.** Abundancia relativa de las especies de anuros por sitio de muestreo dentro del gradiente de contaminación del río Huautla. Se muestra el número de individuos por especie dentro de cada sitio.

**Diversidad, equidad y dominancia**

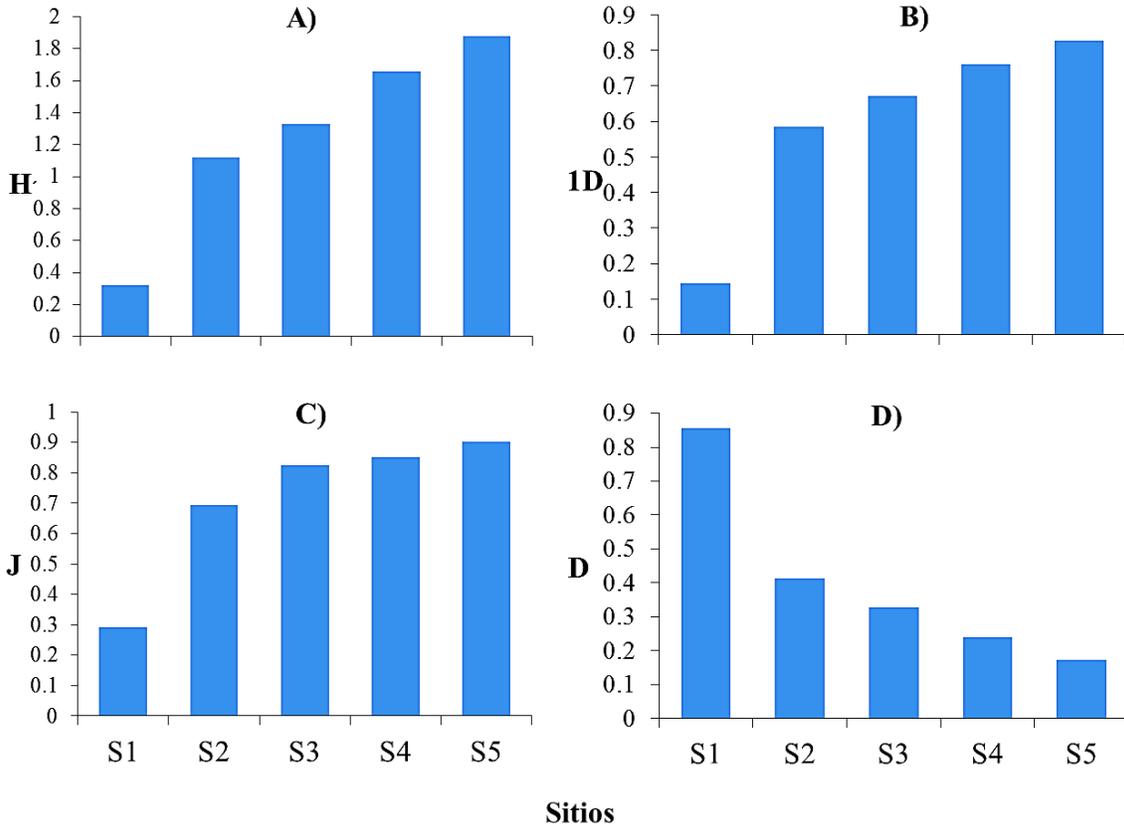
La menor diversidad de Shannon- Wiener se obtuvo en S1 ( $H'_{S1}= 0.32$ ). Los sitios 2 y 3 presentaron diversidades intermedias ( $H'_{S2}= 1.11$ ;  $H'_{S3}= 1.32$ ; Figura 16A). Los sitios 4 y 5 presentaron los valores de diversidad más altos ( $H'_{S4}= 1.65$ ;  $H'_{S5}= 1.87$ ). El sitio con menor diversidad Simpson fue S1 ( $1-D_{S1}= 0.14$ ). Los S2 y S3 presentaron diversidad de Simpson intermedia ( $1-D_{S2}= 0.58$ ;  $1-D_{S3}= 0.67$ ). Los sitios S4 y S5 presentaron los valores de diversidad más altos ( $1-D_{S4}= 0.76$ ;  $1-D_{S5}= 0.86$ ; Figura 16B). La prueba Delta de Solow evidenció que existen diferencias significativas entre los valores del índice de diversidad de Shannon y Simpson de las comunidades analizadas, el S1 fue significativamente distinto al S2, S3, S4 y S5 tanto para valores de diversidad de Shannon como Simpson. El S2 mostró diferencias con el S1 y S5 para los valores de Shannon, para los valores de Simpson el S2 mostró diferencias con el S1, S4 y S5. El S3 mostró diferencias con el S1 y S5 entre los valores de Shannon, los valores de Simpson del S3 mostraron diferencias con los valores del S1, S4 y S5. Los valores de Shannon del S4 mostrarán diferencias con el S1, S2, S3, los valores de Simpson mostrarán diferencias únicamente con el S1. Los valores de Shannon del S5 fueron significativamente distintos con los valores del S1, S2 y S3, los valores del S5 de Simpson mostrarán diferencias con los valores de Simpson del S1, S2 y S3 (Cuadro 13).

**Cuadro 13.** Prueba Delta de Solow aplicada al índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ) y Simpson ( $D'$ ) por sitio. Negritas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ) en la diversidad entre sitios.

|      |    | S1                                   | S2                                  | S3                                   | S4                                   | S5                                   |
|------|----|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| $H'$ |    | <b>0.320</b>                         | <b>1.11</b>                         | <b>1.32</b>                          | <b>1.65</b>                          | <b>1.87</b>                          |
| $D'$ | S1 |                                      | <b>d=0.798,</b><br><b>P&lt;0.01</b> | <b>d=1.008,</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>d=1.336,</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>d=1.556,</b><br><b>P&lt;0.001</b> |
|      | S2 | <b>d=1.385,</b><br><b>P&lt;0.001</b> |                                     | d=0.210, n.s.                        | <b>d=0.537,</b><br><b>P&lt;0.01</b>  | <b>d=0.757,</b><br><b>P&lt;0.001</b> |
|      | S3 | <b>d=2.142,</b><br><b>P&lt;0.01</b>  | d=0.757, n.s.                       |                                      | <b>d=0.327,</b><br><b>P&lt;0.05</b>  | <b>d=0.547,</b><br><b>P&lt;0.001</b> |
|      | S4 | <b>d=3.299,</b><br><b>P&lt;0.001</b> | d=1.915, n.s.                       | d=1.158 n.s.                         |                                      | d=0.220, n.s.                        |
|      | S5 | <b>d=5.199,</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>d=3.814,</b><br><b>P&lt;0.01</b> | <b>d=3.057,</b><br><b>P&lt;0.05</b>  | d=1.899, n.s.                        |                                      |

Abreviaturas indican: S1) sitio 1; S2) sitio 2; S3) sitio 3; S4) sitio 4; S5) sitio 5. Ns) no significativo; d) valor de la prueba delta de Solow.

El valor más bajo de equidad (Pielou) se encontró en S1 ( $J'_{S1}= 0.29$ ). Los valores del índice de equidad de Pielou más altos se registraron en los sitios S5, S4, S3 y S2, respectivamente. ( $J'_{S2}=0.69$ ;  $J'_{S3}= 0.82$ ;  $J'_{S4}= 0.85$ ;  $J'_{S5}= 0.90$ ; Figura 16C). La dominancia más baja se reportó en los sitios S4 y S5 ( $D_{S4}= 0.23$ ;  $D_{S5}=0.17$ ) y la mayor dominancia de especies el S1 ( $D_{S1}= 0.85$ ; Figura 16D). se registraron valores de dominancia en los sitios S2 y S3 ( $D_{S2}= 0.41$ ;  $D_{S3}= 0.32$ ).



**Figura 16.** Índices de diversidad de Shannon A), Simpson B), equidad de Pielou C) y dominancia D) para las comunidades de anuros de 5 sitios de muestreo en el gradiente de contaminación del río Huautla. Las abreviaturas indican: S1) sitio 1, S2) sitio 2; S3) sitio 3; S4) sitio 4; S5) sitio 5.

**Índice de similitud de Jaccard y Sorensen**

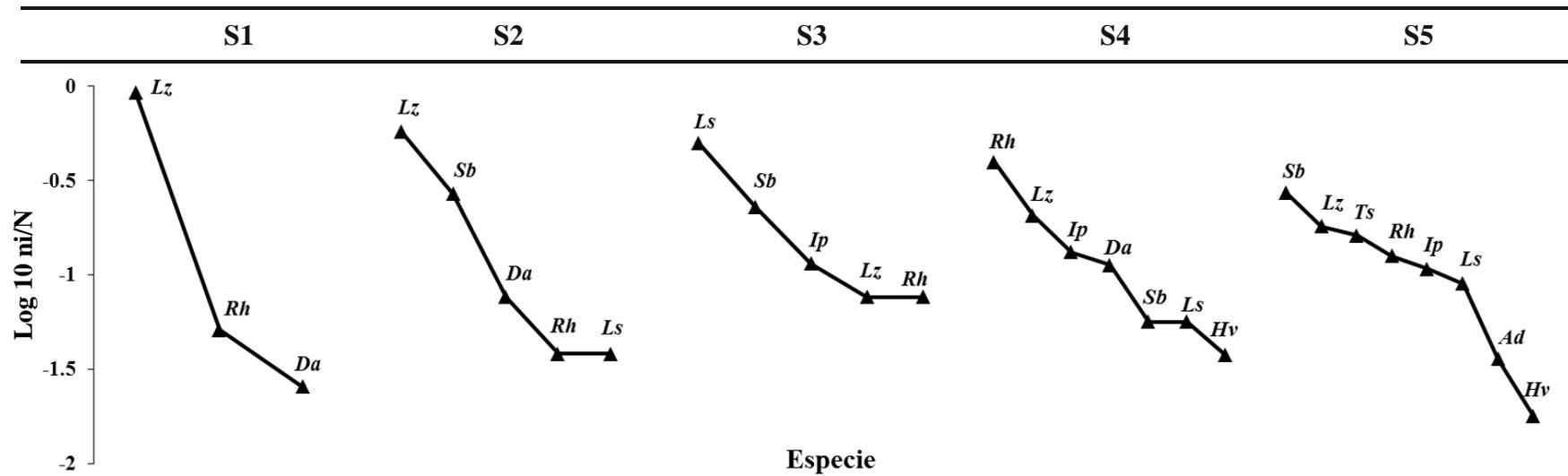
Las comunidades de anuros fueron en general poco similares considerando que se agruparon los datos de los años 2018 y 2019 (Cuadro 14). La mayor similitud de Sorensen se observó entre S2-S3 (62%) y S2-S4 (56%), los valores más bajos de similitud de Sorensen se observaron entre el S1-S3 (12%) y S1-S4 (15%). La mayor similitud de Jaccard se observó entre S2-S3-S4 (71%). La menor similitud de Jaccard se observó entre el S1-S3 (33%) y S1-S5 (37%).

**Cuadro 14.** Índice de similitud de Sorensen y Jaccard. Se muestran los valores de similitud expresados en porcentaje entre sitios de muestreo. Abreviaturas indican: S1) Sitio 1; S2) Sitio 2; S3) Sitio 3; S4) Sitio 4; S5) Sitio 5.

|          |    | Jaccard |    |    |    |    |
|----------|----|---------|----|----|----|----|
| Sitio    |    | S1      | S2 | S3 | S4 | S5 |
| Sorensen | S1 |         | 60 | 33 | 42 | 37 |
|          | S2 | 18      |    | 66 | 71 | 62 |
|          | S3 | 12      | 62 |    | 71 | 62 |
|          | S4 | 15      | 56 | 48 |    | 66 |
|          | S5 | 23      | 42 | 44 | 52 |    |

***Composición de especies de anuros por sitio de muestreo en el gradiente de contaminación del río Huautla***

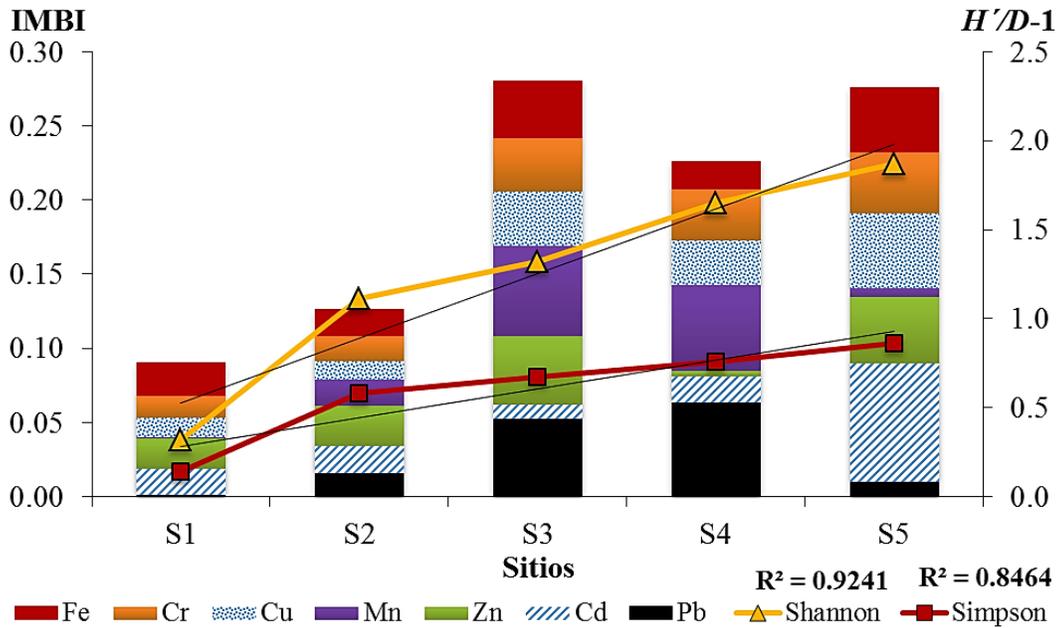
Las curvas rango-abundancia (Figura 17) de los S1, S2 y S3 muestran diferencias en composición de especies respecto a los S4 y S5 cercanos al jal. La curva rango-abundancia para el S1 mostró diferencias relativas en cuanto a la composición respecto a los S2, S3, S4 y S5, donde la especie que se ubica en el rango más alto es *L. zweifeli* respecto a *R. horribilis* y *D. arenicolor*. Para el S2 y S3 las curvas rango-abundancia muestran diferencias relativas en composición de especies con el S1, S4, S5, donde la especie que ocupa el mayor rango en el S2 es *L. zweifeli* y el rango más bajo *R. horribilis* y *L. spectabilis*. Las curvas rango-abundancia para el S4 y S5 mostrarán diferencias relativas en composición de especies respecto a los S1, S2 y S3. En el S4 la especie que ocupó el mayor rango dentro la comunidad fue *R. horribilis* y el menor rango *H. variolosus*. En el S5 la especie que ocupó el mayor rango dentro de la comunidad fue *S. baudinii* y las especies que ocuparon los rangos más bajos fueron *A. dacnicolor* y *H. variolosus*. Las especies que fueron encontradas en todos los sitios de muestreo del gradiente de contaminación del río Huautla fueron *R. horribilis* y *L. zweifeli*, sin embargo su posición jerárquica de acuerdo a la dominancia dentro de las comunidades varía en función del sitio de muestreo. Las especies exclusivas del S5 fueron *A. dacnicolor* e *H. variolosus*.



**Figura 17.** Curvas rango-abundancia de las especies de anuros por sitio dentro del gradiente de contaminación del río Huautla. Se muestra el rango ocupado por cada especie dentro de la comunidad en relación con su abundancia por sitio. Abreviaturas indican: S1) sitio 1; S2) sitio 2; S3) sitio 3; S4) sitio 4; S5) sitio 5. Sb) *Smilisca baudinii*; Lz) *Lithobates zweifeli*; Ls) *L. spectabilis*; Rh) *Rhinella horribilis*; Ip) *Incilius perplexus*; Da) *Dryophytes arenicolor*; Ad) *Agalychnis dacnicolor*; Ts) *Tlalocohyla smithii*; Hv) *Hypopachus variolosus*.

**Efectos de la bioacumulación de metales pesados sobre los valores de diversidad anuros en los sitios del gradiente de contaminación del río Huautla**

El índice multimetal de bioacumulación relativa de cada sitio mostró que el S1 (IMBI= 0.09), S2 (IMBI= 0.13) y S4 (IMBI= 0.23) presentan valores de IMBI bajos. Los valores del índice multimetal de bioacumulación presentaron valores altos en el S3 (IMBI= 0.28) y S4 (IMBI=0.28). Los resultados observados entre los valores de diversidad de Shannon y Simpson en relación a los valores IMBI por sitio, muestran una tendencia de aumento en relación a la cercanía al S4 y S5, siendo los sitios ubicados cerca del jal y corriente abajo, dirección sur, del jal. La tendencia de incremento de los valores del índice de diversidad de Shannon-Wiener estuvieron explicados por un coeficiente de determinación de  $R^2= 0.9241$ . La tendencia de incremento de los valores del índice de diversidad de Simpson estuvieron explicados por un coeficiente de determinación de  $R^2= 0.8464$  (Figura 18).



**Figura 18.** Tendencia a lo largo del gradiente de contaminación de los valores de diversidad de Shannon-Wiener y Simpson en relación con los valores IMBI por sitio. Abreviaturas indican: sitio 1 (S1); sitio 2 (S2); sitio 3 (S3); sitio 4 (S4); sitio 5 (S5); IMBI) índice de bioacumulación multimetal;  $H'$ ) Índice de diversidad de Shannon;  $D-1$ ) índice de diversidad de Simpson.

## Discusión

### *Concentración de metales pesados en agua y sedimentos del gradiente de contaminación del río Huautla*

En este trabajo se evidenció que existen diferentes concentraciones de Pb, Cd, Cr, Cu, Mn, Fe y Zn en el agua y los sedimentos del río Huautla. Los resultados del IMC demuestran que existe un gradiente de incremento en la mezcla de MP en agua (S5>S4>S3>S2>S1) y sedimentos (S5>S4>S3>S2>S1) hacia los sitios cercanos a la zona donde se ubica el jal. Las concentraciones de agua y sedimentos presentaron una correlación positiva del 70% y significativa ( $P<0.05$ ). El patrón general en las concentraciones para todos los MP tanto en agua como en sedimentos mostró que los sedimentos siempre presentaron las concentraciones más altas para Zn, Cu, Mn, lo cual coincide con diversos estudios que han analizado las concentraciones de MP en sedimentos y la columna de agua donde se reportan resultados similares de correlación positiva entre ambas matrices (Davutluoglu et al., 2011; Liu et al., 2015; Kuang et al., 2016; Tang et al., 2016; Li et al., 2019; Pan et al. al., 2017; Pernia et al., 2018). De esta forma los resultados de nuestro estudio confirman que los sedimentos son un control primario de las concentraciones de MP sobre la columna de agua (Acosta et al., 2002; Huang et al., 2012).

Las concentraciones individuales de metales en agua que mostraron un patrón de incremento relativo fueron Pb (S5>S4>S3>S2>S1) y Cu (S5>S4>S3>S2>S1), el Cd (S5>S2>S1>S3>S4), Mn (S5>S4>S1>S3>S2), y Zn (S4>S5>S3>S1>S2), no presentaron un patrón de incremento consistente, sin embargo, las concentraciones más altas se observaron en el S5 y S4, sitios cercanos al jal. Para el caso de los sedimentos de cada sitio, la concentración individual de cada metal no mostró un patrón consistente, Fe (S2>S5>S1>S3>S4); Cr (S3>S2>S4>S1>S5); Mn (S5>S1>S4>S2>S3); Zn (S4>S1>S5>S3>S2); Cu (S4>S5>S1), el Cu no fue detectado en los S2 y S3. El Pb y Cd no fueron detectados en las muestras de sedimento de los sitios de muestreo.

Los resultados de las concentraciones de MP cuantificados en este trabajo proveen de evidencia de que las concentraciones de Cr y el Fe no fueron consistentes entre agua y sedimento, dado que no fueron detectados en la columna de agua, de igual forma las concentraciones de Pb, Cd y Cu en los S2 y S3 no fueron consistentes entre agua y sedimentos. Estos resultados son contradictorios con las observaciones de Li et al. (2017) y Qu et al. (2018) en la cuenca del río Wen-Rui Tang en China, donde ambos autores coinciden en que las concentraciones de Zn, Cu, Cr, Cd, As y Hg siempre fueron consistentes en agua y sedimentos. Sin embargo, en el trabajo de Laino-Guanes et al. (2015) donde se analizaron las concentraciones de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb y Zn en la cuenca del río Grijalva, los autores mencionan un patrón similar al observado en los sedimentos de nuestro trabajo, donde no fue posible cuantificar concentraciones de Pb y Cd, en los sedimentos de la cuenca, sin embargo, no analizan los procesos involucrados que den origen a este patrón.

Otros trabajos (Fan y Wang, 2003; Fendorf et al., 2004; Zhong y Wang, 2006b; Zhong et al., 2012) concluyen en que identificar los procesos que den explicación a estos patrones tienden a ser complicados ya que suelen estar relacionados principalmente con la dinámica de los sedimentos superficiales, como los utilizados en este trabajo, ya que estos sedimentos no son receptores pasivos de MP, sino que por el contrario funcionan como reactores biogeoquímicos en los que los metales depositados participan en una variedad de procesos, en los cuales se incluyen reacciones microbianas, transformaciones redox, intercambio de adsorción-desorción, precipitación, cantidad de materia orgánica, granulometría del sedimento, así como, la disolución de minerales. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la mayor concentración de materia orgánica en forma de sólidos volátiles se encontró en el S3, sin embargo, no se observó un incremento en la cantidad de metales pesados como se ha reportado en otros trabajos en zonas tropicales, sub-tropicales y áridas (Strayer et al. 1997; Sutherland 1998; Arce et al., 2014; Loh et al., 2016). Este resultado es contradictorio de acuerdo con CONAGUA (2007) ya que la mayor cantidad de materia orgánica no se registró en la parte baja de la cuenca, sin embargo, este incremento en el S3 en la cantidad de materia orgánica se encuentra relacionado con la retención de agua de la presa Lorenzo Vázquez, y los procesos que interactúan en la presa como la disminución del flujo del agua y el arrastre de materia orgánica de sitios arriba explican este resultado en este sitio (CONAGUA, 2017). De esta forma consideramos que los procesos que expliquen la ausencia de Pb y Cd en sedimentos puede estar relacionada con la dinámica de los sedimentos, lo que impide la precipitación y retención de estos metales en los sedimentos del río Huautla.

El presente la mayor concentración en los sedimentos de todos los sitios, resultados similares han sido observados por Ramos (2017), en el río Sonora, donde menciona que el hierro tiende a precipitarse hacia los sedimentos y formar compuestos estables con minerales preexistentes o en formas minerales de neoformación, lo que facilita que este metal se mantenga estable mientras las condiciones de pH o redox no sean alteradas. Dicho esto la ausencia de Fe en la columna podría explicarse por este fenómeno, además el Fe puede involucrarse en procesos de sorción que pudiera estar relacionado con limitación y solubilidad de otros MP como el Cr (Amyout et al., 1994) que tampoco fue detectado en la columna de agua. Los resultados de las concentraciones de MP en el río Huautla tienen un amplio valor científico y resulta altamente interesante que las concentraciones de Cr, Fe, Pb y Cd no sean compartidas entre la columna de agua y los sedimentos del río Huautla, lo cual es opuesto a otros trabajos que analizan las concentraciones de metales pesados en agua y sedimentos (Davutluoglu et al., 2011; Liu et al., 2015; Kuang et al., 2016; Tang et al., 2016; Li et al., 2017; Pan et al., 2018; Qu et al., 2018; Mero et al., 2019), donde los resultados muestran evidencia de que ambas matrices no funcionan de forma independiente, por lo que se sugiere el estudio detallado que identifique los procesos que tienen influencia en los sedimentos ya que de estos dependerán las concentraciones de MP en la columna de

agua. Cabe mencionar que las concentraciones encontradas de MP en agua rebasaron los límites permisibles de la NOM-001.

Como se ha mencionado anteriormente se registraron concentraciones de MP en el S1 al noroeste, así como en los S2 y S3 al norte, corriente arriba de la zona donde se ubica el jal. Se considera que estos resultados podrían estar relacionados con actividades antropogénicas de orden primario como agricultura (Reza y Singh, 2010; Huang et al., 2017; Qu, 2018). De igual forma los resultados obtenidos en las concentraciones de metales pesados en los sitios S1, S2 y S3 corriente arriba sin exposición al jal podrían hallar explicación en procesos de origen natural como meteorización de rocas y litogénicas, ya que de forma natural las rocas y suelos de la REBIOSH presentan concentraciones de metales elevadas de forma natural, donde principalmente han sido identificados compuestos azufrados ricos en Pb y Ag (Volke et al., 2005), que al ser meteorizados y posteriormente lavados de los suelos hacia los arroyos en temporada de lluvias, estos se depositan en los sedimentos (Rodríguez, 2006; Volke et al., 2005; Martínez-Pacheco 2008; Ocampo-Díaz, 2016). Siendo estos sedimentos los que determinen las concentraciones a lo largo de la columna de agua con relación al tiempo que está se encuentre en contacto con los sedimentos (Luoma, 1989; Thomas y Bendell-Young, 1998; Chapman et al., 1998; Zhong y Wang, 2006a, 2006b, 2009; Zhong et al., 2012).

En los sitios 4 y 5 de este trabajo las concentraciones de MP en el agua, están relacionadas directamente con las actividades mineras de más de 200 años (Dorado et al. 2005, Volke et al. 2005; Martínez-Pacheco, 2008), siendo la mina San Francisco donde se originó el jal del S4, el cual posee diferentes concentraciones de MP de acuerdo con los resultados de Solís (2016), posterior a la caracterización del jal que enriquece los S4 y S5 del presente trabajo, en dicho trabajo se reportan las siguientes concentraciones de MP de mayor a menor en la base del jal: Fe  $15,413.3 \pm 1,877$ ; Zn  $3,778.3 \pm 333.1$ ; Pb  $2,999.6 \pm 23.1$ ; Mn  $543.2 \pm 127.7$ ; Cu  $90.3 \pm 8.1$ ; Cd  $27.2 \pm 5.2$ ; mitad del jal: Fe  $14,780.0 \pm 216.9$ ; Zn  $1,992.3 \pm 458.4$ ; Pb  $1,017.5 \pm 109.2$ ; Mn  $587.7 \pm 15.4$ ; Cu  $65.0 \pm 3.9$ ; Cd  $26.7 \pm 4.1$  y superficie del jal: Fe  $15,775.5 \pm 423.0$ ; Zn  $1,371.8 \pm 215.6$ ; Pb  $1,197.2 \pm 47.7$ ; Mn  $512.9 \pm 26.6$ ; Cu  $88.0 \pm 21.3$ ; Cd  $16.0 \pm 1.4$ .

De esta forma asumimos que los resultados obtenidos para los S4 y S5 respecto al incremento de las concentraciones de los MP analizados son producto del enriquecimiento por la erosión del jal, resultados similares han sido observados por Gutiérrez y Romero (2015) donde observo un incremento en las concentraciones de MP en la parte media de la cuenca del río Sonora, los autores atribuyen el enriquecimiento de MP en la zona por procesos naturales de erosión en ambos flancos del río en la zona este y oeste por actividades mineras realizadas en el pasado. De esta forma asumimos que las concentraciones de MP en los sitios están relacionadas directamente con las actividades mineras realizadas en el pasado, además de recibir cargas de MP que son de origen natural, las cuales ingresan a los sistemas acuáticos ya sea de forma natural o antropogénica, y se depositan en los sedimentos ubicados en el fondo del cauce, que además son transportados

corriente abajo, teniendo efectos negativos en los cuerpos de agua (Estreves et al., 1996; Bohn et al., 2001; Herrera-Núñez et al., 2013) y consecuentemente en los sistemas biológicos.

Cabe señalar que las concentraciones de metales en agua y sedimentos, podrían solo reflejar la acumulación de metales pesados de la temporada de sequía en el mes de 2019, lo que puede tener relación con los valores del IMC para los sitios de muestreo. Dado que los alcances de este trabajo no analizan los procesos que pudieran dar explicación al patrón observado en la ausencia de concentraciones de Cr y Fe en agua y Pb y Cd en los sedimentos del río Huautla, se sugiere realizar estudios que analicen la dinámica de los sedimentos y como estos contribuyen con las concentraciones en la columna de agua.

### ***Bioacumulación de metales en hígado de anuros***

Diferentes poblaciones de anuros han sido afectadas por altas concentraciones de metales pesados. En México y otros sitios del mundo se han reportado distintos trabajos con distintas especies de anfibios que han sufrido algún tipo de afectación por la bioacumulación de metales pesados (Severtsova et al., 2012a; Severtsova et al., 2012b; Ezemonye y Enuneku, 2012; Severtsova y Aguillón-Gutiérrez, 2013; Severtsova et al., 2013; Córdoba et al., 2013; Aguillón-Gutiérrez y Ramírez-Bautista, 2015; Suárez et al., 2016). En este trabajo se ha identificado un gradiente de concentraciones de Pb, Cd, Cr, Zn, Fe, Mn y Cu en el ambiente ripario de la REBIOSH. Asimismo se detectaron diferentes concentraciones bioacumuladas de Pb, Zn, Cr, Cd, Mn, Fe y Cu en el hígado de *R. horribilis* (S4 Pb>Fe>Zn>Cu>Mn; S5 Fe>Pb>Cu>Zn>Mn) especie de hábitos terrestres, *L. zweifeli* (S1 Fe>Zn>Cu>Pb>Cd; S2 Fe>Zn>Cu>Cd>Pb; S3 Fe>Zn>Pb>Cu>Cd; S4 Fe>Zn>Cu>Pb>Cd; S5 Fe>Zn>Cu>Cd>Pb), *L. spectabilis* (S2 Pb>Fe>Zn>Mn>Cu; S3 Fe>Pb>Zn>Cu>Mn; S4 Pb>Fe>Zn>Cu>Mn; S5 Fe>Pb>Zn>Cu>Mn), especies de hábitos semi-acuáticos y *S. baudinii* (S2 Pb>Fe>Mn>Zn>Cu; S3 Fe>Zn>Pb>Mn>Cu>Cd; S5 Fe>Pb>Zn>Cu>Mn) de hábitos arborícolas. Los MP bioacumulados en las especies utilizadas en este trabajo pueden tener efectos negativos importantes en distintos niveles de organización desde nivel individual, poblacional, comunidad y del ecosistema.

Actualmente se sabe que las principales rutas de exposición a MP está relacionada con la ingestión (dieta o ingestión accidental), contacto dérmico e inhalación (Plumlee y Ziegler, 2007; USEPA, 2018; Rodríguez, 2020). De acuerdo con las observaciones de Barrios-Damián y Melgoza-Plascencia (2005) en un estudio en el ejido Quilamula, en Morelos, analizaron la repartición de alimento de seis especies de un ensamble de anuros, en el que se encuentran *R. horribilis*, *L. spectabilis* y *S. baudinii*, los resultados demostraron que los lepidópteros y coleópteros son los ítems más importantes en la dieta de todas las especies de anuros analizadas. De igual forma Mendoza-Estrada et al. (2007) analizó la dieta de *L. zweifeli* en Yautepec, Morelos, donde observó que los Lepidópteros, Hemípteros, Dípteros, materia vegetal (ingesta accidental), larvas de *Lithobates sp* se encuentran entre los principales ítems seleccionados de esta especie. En otro trabajo realizado por Oliver-

López et al. (2014) los autores reportan casos de canibalismo en *L. spectabilis* en el sur de Puebla.

En el presente estudio se identificaron distintas concentraciones de MP bioacumuladas en el hígado de las especies de interés, los resultados observados están relacionados directamente con las rutas de exposición, donde asumimos que las especies están incorporando las cargas de metales a través de la dieta, así como, de las matrices ambientales agua y sedimento por absorción cutánea. Debido a que los anuros se alimentan de invertebrados y otros anuros, incluso larvas de los mismos (Rahman et al., 2012; Burlibasa y Gavrilá, 2011; Intamat et al., 2016) y se encuentran ubicados al final de red trófica en ambientes acuáticos, tienden a bioacumular las mayores cargas de MP (Naujokas et al., 2013; Tiwari et al., 2014) y estas pudieran ser transferidas a otros organismos de la red trófica, en procesos de biomagnificación. De esta forma consideramos que las rutas de exposición más importantes para los anuros de la cuenca del río Huautla son la dieta y la exposición a los MP en agua y sedimento, matrices contaminadas a las que los anuros se encuentran expuestos por efectos de la historia de vida de las especies.

El Pb se encontró bioacumulado en altas concentraciones en *S. baudinii*, *L. spectabilis* y *R. horribilis* en *L. zweifeli* se detectó en bajas concentraciones. El Pb es un metal bastante común en la naturaleza, del cual no se conoce un rol biológico, por lo que actualmente se ha convertido en un problema de contaminación a nivel global importante, ya que tiende a formar muchas sales, óxidos y compuestos organometálicos (Eisler, 2000; Rahimi, 2013; Londoño-Franco et al., 2016; Aguillón-Gutiérrez, 2018;). En el trabajo realizado por Jofré et al., 2012, los autores identificaron la bioacumulación de Pb en seis especies de anuros, donde el Pb se encontró bioacumulado en todas las especies, independientemente del grupo funcional al que pertenecen, este resultado es similar al resultado observado en nuestro estudio, donde todas las especies independientemente de su grupo funcional bioacumulaban distintas cargas de Pb en el hígado. Los autores identificaron que la mayor concentración de Pb se registró en la especie de hábitos terrestres *Rhinella arenarum* 2.65 a 5.08 mg/L respecto a la especie arborícola *Hypsiboas cordobae* 2.66 y 3.56 mg/L. Estos resultados son similares a los observados en este estudio, donde la concentración más alta de Pb se registró en *R. horribilis* 2.86 a 4.06 mg/L, siendo la especie de mayor tamaño respecto a *S. baudinii* 0.99 a 3.14 mg/L. La bioacumulación de Pb en anfibios ha sido relacionada con anomalías macroscópicas (Rowe et al., 1996; Burkhart et al., 1998; Aguillón-Gutiérrez 2012; Severtsova y Aguillón-Gutiérrez, 2013; Aguillón-Gutiérrez y Ramírez-Bautista, 2015). Sparling, (2000), observó que la exposición de larvas de *Lithobates sphenoccephalus* a Pb provocó anomalías esqueléticas en fémur y húmero, así como escoliosis (desviaciones laterales de la columna) clinodactilia (deformación de dedos), braquimelia y ectromelia. La presencia de malformaciones tanto en larvas como anuros adultos, puede incrementar las tasas de depredación de larvas y anuros adultos, por deficiencias en la movilidad ante los depredadores, así como un incremento energético en el desplazamiento para conseguir presas. En el presente trabajo

no fueron detectados huevos ni renacuajos en los sitios cercanos al jal, lo que pudiera ser un posible efecto de la exposición de renacuajos a Pb que resulta en la disminución de anuros en estadio larvario.

El Fe, que es un metal pesado esencial cumple en los organismos funciones esenciales como el transporte de oxígeno y dióxido de carbono, sin embargo presento los niveles de acumulación más elevados en todas las especies utilizadas en este trabajo. Severtsova et al., 2013; Severtsova y Aguillón-Gutiérrez, 2013, en bioensayos de laboratorio en Rusia con dos tratamientos, colocaron en dos acuarios de 70 litros introdujeron 20 clavos con una calidad de 99% de hierro, al segundo acuario control no se le administró nada, en cada acuario se colocaron 100 larvas de *Rana temporaria* y *Bufo bufo*. Para la evaluación de los efectos de la exposición y bioacumulación de Fe en las larvas cada cinco días fueron sacrificadas 25 larvas por tratamiento. Los autores observaron que en el tratamiento en que las larvas estuvieron expuestas a Fe, el intestino y vísceras presentaron coloraciones rojizas, además evidenciar el retraso en el desarrollo y crecimiento de las larvas de *R. temporaria* y *B. bufo*, mostrando diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) con el grupo control. En otro estudio realizado en México por Aguillón-Gutiérrez y Ramírez-Bautista 2015, con larvas de *Dryophytes plicatus* en un bioensayo de laboratorio con dos tratamientos, uno al que se le introdujeron 20 clavos con una calidad de 99% de hierro y un control al que no se le administró nada; en cada acuario de 70 litros se colocaron 100 larvas. Para la evaluación de los efectos de la exposición y bioacumulación de Fe en las larvas cada cinco días fueron sacrificadas 25 larvas por tratamiento. Los autores reportan que en el tratamiento en que las larvas estuvieron expuestas a Fe, el intestino y vísceras presentaron coloraciones rojizas, además del retraso en el desarrollo y crecimiento de las larvas, así como, anomalías cutáneas y de pigmentación. Los resultados obtenidos sobre las altas concentraciones bioacumuladas de Fe en anuros, podrían tener relación con lo descrito por Solís, (2016) para el jal de Huautla que comprende los S4 y S5, dónde el Fe es el metal que presenta la mayor concentración en la parte superior, media y baja del jal, además nuestros resultados evidenciaron que en los sedimentos de río corriente arriba el Fe se encuentra en concentraciones elevadas. De esta forma los anuros al estar en contacto con los sedimentos de río durante la fase larvaria están expuestos a altas concentraciones de Fe y los adultos pueden seguir ingresando concentraciones de este metal a sus tejidos a través de la dieta o al estar en contacto con los sedimentos y suelos contaminados, por Fe.

El Cd fue el metal que se encontró bioacumulado en menor concentración en el tejido hepático de *S. baudinii*, *L. spectabilis* y *L. zweifeli*, en *R. horribilis* no se detectaron concentraciones de Cd. El Cd ocupa el sexto lugar entre los Mp más tóxicos (Perez-García y Azcona-Cruz, 2012; Nordberg, 2017), es un metal raro en la naturaleza y forma óxidos complejos, sulfuros y carbonatos con Zn, Pb y menas de Cu (Perez-García y Azcona-Cruz, 2012). De forma natural no se encuentra en estado libre y el único mineral de cadmio es la greenockita o sulfuro de cadmio, la forma en la que se libera el Cd principalmente es por la

fundición y refinado de los minerales de Zn (Magnusson, 2014). En animales los rangos de bioacumulación tienden a ser muy diversos, pero principalmente las especies con dieta vegetal tienden a bioacumular mayores concentraciones de Cd (Dickson, 1980; Londoño-Franco et al., 2016; Perez-García y Azcona-Cruz, 2012).

La relación entre la exposición a Cd por la dieta y a través de la piel por las concentraciones del agua, nos permite inferir que las especies de anuros utilizadas en este estudio podrían estar ingresando las cargas de Cd a sus tejidos por medio por estas rutas de exposición. Los ítems de mayor preferencia en los estudios de nicho trófico antes mencionados, indican que las presas consumidas por anuros tienden a ser consumidores de tipo primario y como se ha mencionado anteriormente la materia vegetal o subproductos de esta tienden a bioacumular mayores concentraciones de Cd (Dickson, 1980; Londoño-Franco et al., 2016; Perez-García y Azcona-Cruz, 2012), es así como asumimos que los ítems alimenticios de las especies de anuros utilizadas en este estudio podrían estar adquiriendo las cargas de Cd, que al ser depredados por consumidores secundarios como el caso de los anuros, estos podrían estar ingresando una parte del Cd bioacumulado en sus tejidos y lo pudieran facilitar la biodisponibilidad para sus depredadores ya sea en el mismo nivel trófico o en niveles superiores. Cabe mencionar que las especies de este trabajo presentan larvas acuáticas que se alimentan del medio hasta el momento de la metamorfosis y durante este período se alimentan de materia vegetal y de otras larvas de anuros y otros animales (Demichelis et al., 2001; Newman y Unger, 2003; Selvi et al., 2003; Mitchell et al., 2005; Marques et al., 2008, 2009; Burlibasa y Gavrilá, 2011; Aguillón-Gutierrez y Ramírez-Bautista, 2015), lo que indicaría el ingreso de este metal desde estadíos larvarios y la fase adulta.

Otros estudios (Slooff y Baerselman, 1980; Leuven et al., 1986; Woodall et al., 1988; Lefcort et al., 1998; Gastelum et al., 2019) que han analizado en ensayos de laboratorio la exposición aguda y los efectos de la bioacumulación de Cd en anuros en estadíos larvarios, han demostrado que los efectos tienden a expresarse de forma diferencial, ya que los efectos tienden a encontrarse relacionados con la susceptibilidad de las especies, lo que a su vez está altamente relacionado con el tiempo de exposición y las concentraciones a las que los anuros se encuentran expuestos, en estado larvario o en su fase adulta. En nuestro trabajo se reportaron concentraciones de Cd en agua de 0.93 a 0.108 mg/L y concentraciones bioacumuladas de Cd en un rango de 0.010 a 0.031mg/L de Cd en el hígado de las especies de anuros analizadas, en sedimentos no se detectó Cd. Las observaciones de Leuven et al. (1986) en un ensayo de laboratorio evidenció que cuando los embriones de *Rana temporaria* eran expuestos a concentraciones de hasta 0.004 mg/L de Cd no existía un efecto ellos, sin embargo, la misma cantidad de Cd fue tóxica para las larvas, los autores concluyen que puede estar relacionado con la forma de alimentación, ya que los embriones dependen del contenido alimenticio del saco vitelino, mientras que las larvas se alimentan del medio acuático bioacumulado el Cd y presentado efectos negativos sobre la sobrevivencia.

Observaciones más recientes realizadas por Gastelum et al. (2019) dieron evidencia en un estudio de laboratorio que la dosis letal media (CL<sub>50</sub>) en larvas de *Lithobates catesbeianus* fue de 0.115 mg/L durante 96 horas. Además observo que a concentraciones de 0.20 a 0.25 mg/L posterior a ocho horas de exposición y a concentraciones de exposición de 0.175 y 0.15 mg/L posterior a cinco horas, tuvieron efectos sobre el comportamiento de nado de las larvas. El porcentaje de mortalidad a una concentración de 0.10 mg/L, rango similar al observado en nuestros resultados, mostró el 100% de sobrevivencia a las 24 horas, disminuyendo a 60% a las 48, 72 y 96 horas. Además se realizó el análisis histológico para observar los daños causados por la exposición y bioacumulación de Cd. Los resultados dieron evidencias daños producido en larvas posterior a la exposición de Cd, donde se observó que en todas las concentraciones existió daño. Específicamente en la concentración de 0.10mg/L se observaron células pignoticas cariorrexicas, con el núcleo fragmentado que posteriormente pasa a pignosis y el núcleo estalla e inicia un proceso de muerte celular.

Los resultados observados en las concentraciones de Cd en el agua del río Huautla se encuentran en un rango que pudiera tener efectos sobre el comportamiento de nado de las larvas de anuros de acuerdo con lo observado por Gastelum et al. (2019), lo que pudiera facilitar los procesos de depredación de las especies de anuros en estadios larvarios para las especies de anuros de la zona, además de incrementar la mortalidad a 40% a una concentración de 0.10mg/L, principalmente por daño celular. Cabe mencionar que no fue posible registrar larvas de anuros en los sitios de muestreo. Teniendo en cuenta los resultados previos observados por otros autores (Rowe et al., 1996; Burkhart et al., 1998; Gastelum et al., 2019), donde los efectos posteriores a la bioacumulación de Cd a nivel individual en morfología resultaron en daños en piel y el desprendimiento de ella en larvas sobrevivientes a la exposición a Cd ya sea por ingesta o exposición al medio, ya que en estadios larvarios las vías de exposición están relacionadas con la ingesta y por la respiración a través de la piel, siendo la piel el órgano más afectado. De esta forma asumimos que la combianción de los efectos provocados en larvas por la exposición y bioacumulación de Cd pudiera estar estrechamente relacionada con la disminución de los tamaños poblacionales de anuros de la cuenca del río Huautla, lo que pudiera promover cambios, en otros niveles de organización como la comunidad en los valores de riqueza, abundancia y diversidad, así como efectos en la estructura trófica del ecosistema (Home y Dunson, 1994; Venturino et al., 2003; Gastelum et al., 2019).

El Cr no se encontró bioacumulado en el hígado de *R.horribilis*, *S. baudinii*, *L. spectabilis* y *L. zweifeli*, aunque se registraron concentraciones de Cr en sedimentos de 1.00 a 1.96 mg/L. La presencia de Cr de forma general en ambientes acuáticos está estrechamente relacionada con fuentes antrópicas como la minería y la oxidación de los jales (IPS WHO, 1988; Natale, 2006), sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de la movilización, migración y biodisponibilidad del cromo en la biosfera (Natale, 2006). El Cr es un metal que posee todos los estados de oxidación desde -2 hasta +6, de forma natural la

forma trivalente es la más común y más estable (IPS WHO, 1988; Natale, 2006). Sin embargo, solo los estados de oxidación Cr (III) y Cr (VI) tienen importancia biológica causando efectos contrarios a los organismos, ya que el estado de oxidación Cr (III) es considerado como un nutriente para humanos, animales y plantas, en cambio el Cr (VI) es tóxico y su presencia en el ambiente indica contaminación de tipo antrópica (WHO, 1988; Natale, 2006). Los resultados observados en este trabajo mostraron que las concentraciones de Cr estuvieron bioacumuladas en las especies de interés por debajo del límite de detección (0.003mg/kg).

Zohu et al. (2008) en un ensayo de laboratorio determinaron que la  $CL_{50}$  de Cr se obtiene para larvas de *Bufo viridis* posterior a 96 horas a una concentración de 1.1mg/L de Cr. En nuestro trabajo registramos concentraciones de Cr en sedimentos en un rango de 1.00 a 1.96 mg/kg, donde los renacuajos expuestos pudieran presentar intoxicación, sin embargo, en el hígado de las especies la concentración de este metal estuvo por debajo del límite de detección (0.003 mg/kg). Otras observaciones realizadas por Rendon (2015) en un trabajo de campo en el río Marabasco en Colima, reporto concentraciones en sedimentos de Cr de 18.4 a 20.8 mg/Kg y un rango de bioacumulación de Cr en el hígado de *R. horribilis* de 0.01 a 0.02 mg/Kg, siendo un resultado opuesto a nuestros resultados. La posible explicación de estos resultados pudiera estar relacionada con variaciones en las concentraciones del Cr, que al ser un metal esencial pudiera estar siendo regulado por mecanismos fisiológicos para mantener condiciones homeostáticas (Stoylar et al., 2008).

El Mn fue un metal esencial que se encontró bioacumulado en el hígado de *R. horribilis*, *S. baudinii*, *L. spectabilis* y *L. zweifeli*, sin embargo, este metal es considerado esencial en concentraciones adecuadas para plantas, animales y humanos (Beltrán y Gómez, 2015; Campo-Tatis y Simanca-Martínez, 2019). El Mn es uno de los elementos más abundantes de la corteza terrestre con varios estados de oxidación (+2, +3, +4, +5, +6, +7) hallándose en suelos, sedimentos, agua y en los organismos (Nordberg, 2017). Las principales rutas de exposición a Mn es a través de la dieta y por inhalación, sin embargo, el Mn absorbido por sangre es eliminado rápidamente y tiende a acumularse en el hígado, aunque en concentraciones excedentes puede provocar la migración de este metal a hacia otros tejidos como riñones, intestino delgado, glándulas endocrinas y huesos (Nordberg, 2017). Stoylar et al. (2007) observó en *Pelophylax ridibundus* (antes *Rana ridibunda*) variación en las concentraciones de Mn en el hígado de esta especie donde observo en primavera  $9.1 \pm 0.7$  mg/Kg, verano  $15.2 \pm 1.2$ , otoño  $1.9 \pm 0.2$ .

Los resultados observados para las especies de anuros utilizadas en este estudio muestran concentraciones menores siendo *R. horribilis* la especie en la que se encontró el rango de Mn más alto 0.15 a 0.21 mg/Kg y en las especies semiacuáticas se detectó el Mn en *L. spectabilis* 0.0015 a 0.24 mg/Kg, en *L. zweifeli* la concentración estuvo por debajo del límite de detección (0.0015 mg/Kg) y la especie arborícola *S. baudinii* 0.0015 a 0.24 mg/Kg. Estos resultados observados en nuestro trabajo difieren de los resultados de Stoylar et al. (2007), sin embargo los autores mencionan que las concentraciones observadas en *P.*

*ridubundus* son bajas, en comparación con otras poblaciones de la misma especie en zonas urbanas. De igual forma nuestras observaciones son resultan ser altamente interesantes ya que las especies del río Huautla presentaron concentraciones de forma general en un rango de 0.0015 a 0.23 mg/Kg en el hígado, siendo resultados que están por debajo de lo observado en *P. ridubundus* y otros organismos acuáticos como bivalvos (Stoylar et al., 2004). La variación en las concentraciones de Mn en el hígado de las especies de anuros del río Huautla, pudieran reflejar de la regulación de este metal por mecanismos homeostáticos, debido a cambios en los requerimientos fisiológicos de las especies (Rolf y Hadiger, 1999; Stoylar et al., 2008).

El Zn fue un metal que se encontró en todas las especies de anuros de este trabajo. Este metal se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y constituye aproximadamente el 0.02% de la corteza terrestre (Nordberg, 2017). El Zn es un metal esencial de importancia en el metabolismo de ácidos nucleicos y síntesis de proteínas (Nordberg, 2017). El Zn es un metal que no se bioacumula en el organismo, sin embargo, algunas sales de Zn como el cloruro de zinc, sulfato de zinc o en combinación con arsénico(As) pueden ingresar a los organismos por inhalación, contacto cutáneo o ingestión causar intoxicación (Nordberg, 2017). Rendon (2015) observó concentraciones de Zn en hígado de *R. horribilis* en un rango de 0.54 a 0.86 mg/Kg. Estos resultados son similares a los observados en nuestro trabajo donde se observó un rango de Zn en el hígado de *R. horribilis* de 0.41 a 0.71 mg/L. Stoylar et al. 2008 en un estudio de campo identifico diferentes rangos en las concentraciones de Zn en tres estaciones del año primavera  $2.4 \pm 0.4$  mg/Kg, verano  $9.6 \pm 2.0$  y otoño  $2.7 \pm 0.4$  en una zona rural. Los autores observaron correlación entre la concentración de Zn en el hígado de *R. ridibunda*, lo cual es indicador de la regularidad de los mecanismos de homeostasis con respecto a los requerimientos fisiológicos de está rana durante el año. Estos resultados son cercanos a los a los observados en las especies de anuros ( $3.24 \pm 5.57$ ) del río Huautla, aunque no se realizó un muestreo durante las distintas estaciones del año, estos resultados podrían indicar que las concentraciones de Zn se encuentran en niveles adecuados ya que para *L. zweifeli* se observó una correlación positiva entre los metales bioacumulados y las concentraciones de las matrices ambientales.

El Cu se encontró bioacumulado en todas las especies de anuros de interés de este trabajo en un rango de 0.01 a 0.43 mg/Kg. El Cu es un metal ampliamente distribuido en todos los continentes y es esencial para la mayoría de los organismos vivos ya que forma parte integral y funcional de proteínas y sistemas enzimáticos (Nordberg, 2017). A pesar de la importancia del Cu en los organismos, en concentraciones elevadas tiende a ser altamente tóxico para los vertebrados (Stoylar et al., 2008; Nordberg, 2017). Resultados obtenidos por Beck (1956) muestran un rango de bioacumulación de Cu en el hígado de *R. horribilis* (antes *Bufo marinus*) entre  $468 \pm 140$  mg/Kg, lo cual es similar con las observaciones realizadas por Stoylar et al. (2008) donde los autores identificaron en un estudio de campo en Ucrania, que *P. ridibundus* bioacumuló diferentes concentraciones de

Cu en tres estaciones primavera  $49.8 \pm 4.0$ , verano  $30.0 \pm 2.4$  y otoño  $5.6 \pm 0.7$  en una zona rural, los autores concluyen que la bioacumulación de Cu en *P. ridibundus* se encuentra entre 5 y 50 veces por encima de lo reportado para otros vertebrados acuáticos posterior a la exposición a este metal lo cual ha sido verificado en otros trabajos con *P. ridubundus* Loumbourdis y Wray (1998)  $1041 \pm 153$  mg/kg y Papadimitriou y Loumbourdis (2003)  $473 \pm 3.26$ .

Nuestros resultados difieren de estas observaciones anteriores ya que las concentraciones de Cu bioacumuladas en el hígado de las especies de anuros del río Huautla de forma general oscilaron entre 0.016 a 0.043 mg/Kg y para *R. horribilis* la bioacumulación de Cu en hígado oscilo entre  $0.41 \pm 1.39$  mg/Kg. Estos resultados resultan altamente interesantes ya que las concentraciones de Cu bioacumuladas en las especies de anuros de este trabajo están muy por debajo de lo reportado en otros trabajos que han analizado la bioacumulación de Cu en otras especies de anuros.

Todas las especies presentan reproducción con huevos y larvas acuáticas. Esta diferenciación en el uso de ambientes acuáticos y terrestres, determinado por los rasgos funcionales asociados con el ambiente (Luck et al., 2012) tiene implicaciones ecológicas importantes en la disminución de competencia que resulta en un mejor reparto de los nichos espaciales y temporales (Duellman 1989; Cortés-Gómez et al., 2016). Teniendo en cuenta que las diferencias entre los rasgos funcionales de las especies están relacionados en los procesos ecológicos, estos pueden estar asociados a la sensibilidad de las especies, como con los periodos de exposición a compartimentos ambientales como agua, suelo y sedimentos contaminados por metales pesados (Freda, 1991; Sparling y Lowe, 1996; Jofré et al., 2010; Leynaud et al., 2006; Vaira, 2002).

Los resultados obtenidos de acuerdo con el IMBI demuestran que existen diferencias en la mezcla de metales pesados bioacumulados en *S. baudinii*, *L. spectabilis*, *R. horribilis*, en *L. zweifeli* no se observaron diferencias entre sitios de los valores IMBI. Los valores IMBI en las especies de anuros utilizadas no se comportaron de acuerdo al gradiente de contaminación por metales pesados. Sin embargo, la proporción de cada metal entre sitios y entre especies presenta diferentes concentraciones entre sitios y entre especies, estos resultados se pueden explicar debido a que la acumulación de metales pesados en anfibios en general, no solo depende de las concentraciones de metales en los compartimentos ambientales, sino también de factores como la afinidad de los tejidos para bioacumular los distintos metales, tasas diferenciales de captación, deposición, tiempo de exposición de cada especie y la tasa de excreción, es decir diferencias en la toxicocinética y toxicodinámica de los metales pesados (Jeziarska y Witeska, 2006; Putshaka et al. 2015; Thanomsangad et al. 2019).

En este trabajo se demuestran que en el ejido Huautla existe bioacumulación de metales pesados en el tejido de cuatro de las especies más abundantes anuros que pertenecen a diferentes gremios y que el hígado es un órgano en donde las concentraciones de metales detectadas, pueden reflejar las concentraciones que se encuentran en el

ambiente. Dicha bioacumulación en los anuros podría tener efectos considerables en el transporte de las cargas de metales en agua, sedimento hacia el medio terrestre, así como, influir en las redes tróficas ya que los anfibios son el vínculo directo entre los flujos de energía entre ambientes terrestres y acuáticos, además de estar en los niveles intermedios de las redes tróficas.

Sin embargo, se debe hacer mención de que las muestras de tejido fueron provenientes de las temporadas de lluvias de 2018 y 2019 y podría haber variación en las concentraciones de metales entre años, por la biodisponibilidad de metales en los compartimentos ambientales, influenciado principalmente cambios fisicoquímicos. Asimismo la bioacumulación puede ser un proceso relacionado con las características individuales de los organismos, donde dependerá de su condición física, tamaño, sexo, y las tasas de bioacumulación y excreción.

### ***Estructura de la comunidad de anuros***

#### ***Aspectos generales***

Los inventarios de anuros más recientes indican que para el bosque tropical caducifolio de Morelos existen 29 especies de anuros (Castro-Franco et al., 2006) que representan el 76.31% de las 38 especies de anuros presentes en el estado. En el inventario más reciente de anuros de la REBIOSH se reporta un total de 20 especies de anuros (Herrera-Balcázar, 2014). Para la zona de estudio existe un registro de 12 especies de anuros (Roa-Mata, 2013). La riqueza registrada en este estudio es de nueve especies que representa el 23.68% de la riqueza de anuros del estado; 31% de la riqueza de anuros para el bosque tropical caducifolio de Morelos; 45% de las especies reportadas para la REBIOSH; 75% de las especies de anuros de la zona de estudio. Los estimadores de riqueza empleados indican que se pueden encontrar entre 10 y 11 especies, sin embargo, este resultado subestima la riqueza de especies reportada por Roa-Mata (2013), lo cual puede estar relacionado con las diferencias en el diseño, esfuerzo de muestreo y los estimadores utilizados, así como, las posibles diferencias en la estructura del hábitat, lo que puede reflejarse en las comunidades actuales, espacial y temporalmente.

#### ***Diversidad de especies de anuros en los sitios del gradiente de contaminación por metales pesados del río Huautla.***

La mayor riqueza, abundancia, y diversidad de especies de anuros fue registrada en el sitio 4 y 5, que son los sitios que están expuestos al jal. La menor riqueza, abundancia y diversidad de especies se observó en los sitios 1, 2 y 3 corriente arriba del jal. Nuestros resultados coinciden con los datos de Suárez et al. (2016) donde no se observaron efectos negativos sobre la comunidad en riqueza, abundancia y diversidad de anuros en río Marabasco en Colima, México. Sin embargo Reques (2008), reportó una disminución de la riqueza, abundancia y diversidad en el río Guardinama en España posterior al derrame de lodos contaminados con metales pesados. De igual forma Ficken y Byrne (2013) reportan una correlación negativa entre la riqueza de anuros en sitios contaminados con metales

pesados en el corredor de Merri Creek en el sureste de Australia. La familia con mayor riqueza de especies fue Hylidae con tres especies siendo un patrón frecuente en ensamblajes neotropicales (Duellman, 1999; Pansonato et al., 2011); resultados similares fueron observados en el estudio de comunidades de anuros en el río Marabasco por Suárez et al. (2016) afectado por metales pesados producto de actividades mineras y por Roa-Mata et al. (2013) en los sitios S2 y S3 del presente estudio. La familia con menor riqueza fue Microhylidae con una especie.

La distribución de anfibios dentro del paisaje está fuertemente relacionada con los rasgos funcionales y los procesos ecofisiológicos los cuales les permiten mantener las condiciones hídricas internas en ambientes estacionales o deshidratantes (Urbina-Cardona et al., 2014; Negret, 2015). De esta forma, los jales en los ambientes estacionales o secos pueden comportarse como una isla dentro del paisaje, ya que al ser altamente porosos mantienen altas cantidades de humedad (Terlien, 1998; Ramos-Arroyo y Siebe-Grabach, 2006). De igual forma la humedad podría favorecer el establecimiento natural de la vegetación en los jales en abandono, lo que disminuye la intensidad de la erosión y aumenta la retención de los mismos por efecto de las raíces, además de incrementar la cantidad de materia orgánica en el jal (Ramos-Arroyo y Siebe-Grabach, 2006). Lo anterior podría explicar los resultados obtenidos en nuestro estudio donde la mayor riqueza, abundancia y diversidad de anuros se reporta en la zona de jales. Además la porosidad del jal podría facilitar los procesos excavación a las especies de anuros que habitan las zonas de jales, para el proceso de estivación ya que las características del jal pudieran disminuir el costo energético en la excavación de madrigueras para la temporada de estiaje (Sasa y Bolaños, 2004). A su vez podría ser un refugio de fácil acceso para evadir la temporada de sequía hasta la siguiente época reproductiva marcada por la temporada de lluvias.

Las especies más abundantes fueron *Lithobates zweifeli* (n= 74), *Lithobates spectabilis* (n= 22) que al ser especies semi-acuáticas con desarrollo larval dentro del agua (García y Ceballos, 1994) mantienen una estrecha relación con los hábitats riparios durante la mayor parte del año (Chávez-Ramírez et al., 2017), siendo estos rasgos los que explican la alta abundancia de esta especie, ya que el estudio estuvo enfocado en el margen del río. La especie de sapo *Rhinella horribilis* (n=33) también presentó alta abundancia dentro del río Huautla sobretodo en el sitio 4 expuesto directamente al jal. Navas et al. (2002), menciona que algunas especies de anfibios de zonas estacionales con baja disponibilidad hídrica presentan impermeabilización de la piel y producción de ceras de origen glandular cutáneo, lo que podría explicar en cierta forma la abundancia de esta especie en el sitio donde están registradas las concentraciones más altas de metales pesados, ya que su abundancia podría estar relacionada con la presencia de los rasgos apropiados que le permiten sobrevivir y reproducirse bajo esas condiciones ambientales. *Smilisca baudinii* (n= 31) también mostró una abundancia alta y aunque es una especie de hábitos arborícolas presenta un modo reproductivo que incluye larvas acuáticas, lo que podría explicar su abundancia en los sitios. Las especies menos abundantes fueron *Hypopachus variolosus* y

*Agalychnis dacnicolor*, está última especies es de talla grande en comparación el resto de Hylidos de la zona y tiene una preferencia por hábitats antropogénicos, lo cual coincide con lo propuesto por Suazo-Ortuño et al. (2008) y Mendenhall et al. (2014), mencionan que los anfibios de tallas corporales grandes que se reproducen en pozas cuyas larvas se reproducen en el agua y huevos en hojas encima del agua, presentan mayor afinidad por ambientes perturbados, lo cual coincide con las observaciones de este trabajo en la zona de estudio.

Es poco lo que se conoce sobre la respuesta de los anuros ante eventos de disturbio por contaminación de metales pesados, debido a que la mayor parte de los estudios que utilizan como modelo de estudio a los anuros para evaluar las respuestas a la contaminación por metales pesados presenta una tendencia hacia los bioensayos de laboratorio (Morinigo et al. 2016). Por todo esto, estudios como este, son especialmente importantes ya que se reportan patrones y respuestas ecológicas en las comunidades de anuros en ambientes contaminados por metales pesados, además de que permiten identificar especies de interés para el biomonitoreo a nivel local o escalas espaciales más amplias, lo cual es novedoso y de gran relevancia científica.

## Conclusiones

1. En el presente trabajo se demuestra la presencia de un gradiente de contaminación por metales pesados semejante en agua y sedimento, los cuales se encuentran correlacionados y alcanzan los valores más altos en la cercanía al jal de esta forma aceptamos la hipótesis planteada en este trabajo sobre las concentración de metales en agua y sedimento.
2. La concentración de metales pesados distribuidos espacialmente a lo largo de la cuenca del río Huautla está determinada por la presencia de residuos mineros de actividades mineras pasadas y por procesos naturales en los sitios corriente arriba del jal, producto de la composición mineralógica de la zona y procesos geomorfológicos de la cuenca.
3. En esta investigación se demuestra que existen diferentes concentraciones bioacumuladas de Pb, Zn, Cu, Mn, Fe, Cd en todos los sitios de muestreo en el hígado de las cuatro especies utilizadas en este trabajo *Rhinella horribilis*, *Lithobates zweifeli*, *L. spectabilis* y *Smilisca baudinii*, especies pertenecientes a diferentes grupos funcionales.
4. La riqueza y abundancia y diversidad de especies de anuros espacialmente mostró diferencias a lo largo de todos los sitios de muestreo, siendo los sitios con menor diversidad aquellos que espacialmente se ubican hacia el norte corriente arriba del sitio donde se encuentra ubicado el jal.
5. Los sitios que presentan los valores más altos de riqueza, abundancia y diversidad, además de menor dominancia y mayor equidad en las comunidades de anuros fueron los sitios ubicados en la cercanía al jal, lo que es contrario a lo propuesto por la hipótesis de este trabajo, por lo tanto, rechazamos la hipótesis planteada.

## Perspectivas

1. Se sugiere mantener el monitoreo de las concentraciones de metales en agua y sedimento e incluir el monitoreo de las comunidades de anuros presentes en el gradiente de contaminación identificado en el río Huautla, además incluir en su diseño la evaluación de variables ambientales, las cuales determinan la preferencia de hábitats y micro-hábitats, de esta forma se identificarían las principales rutas de exposición para los anuros de la zona de estudio.
2. Actualmente no existen publicaciones que evalúen bioacumulación de metales pesados y sus efectos potenciales sobre las poblaciones de anuros, por lo tanto, se sugiere el análisis de las poblaciones de las especies más abundantes de este trabajo, con el objetivo de identificar los posibles efectos a nivel poblacional y como estos pudieran estar afectando las comunidades y al ecosistema, además de procesos de biomagnificación, ya que los anuros se encuentran en niveles intermedios de la red trófica.

## Referencias

- Agostini, M., G.** (2013). Ecotoxicología de anfibios en agroecosistemas del noreste de la región pampeana (Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas).
- Aguillón-Gutiérrez, D., R.** (2018). Anomalías macroscópicas en larvas de anfibios anuros. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 1(1), 8-21.
- Aguillón-Gutiérrez, D. y Ramírez-Bautista, A.** (2015). Anomalías frecuentes en una población de *Hyla plicata* (Anura: Hylidae) expuesta a plomo y hierro durante el desarrollo postembrionario. *Biocyt* 8:515–529.
- Agyekum, A., A., Frimpong C., E., Armah, D., Agyei-Mensah, R., Adongo Abdul-Malik, A., Opoku-Danquah, J., y Derry, D.** (2012). Occurrence of toxic heavy metals (Hg, Pb and Cd) in fish on Ghanaian markets. *Elixir Food Sci*, 48, 9669-9671.
- AL-Robai, H.** (2013). Determination some Heavy metals in Sediments of Shatt Al-Hilla River by Using Modified Single Chemical Fractionation Technique. *Journal of University of Babylon*, 21(8), 2811-2818.
- Amyot, M., McQueen, D. J., Mierle, G., y Lean, D. R.** (1994). Sunlight-induced formation of dissolved gaseous mercury in lake waters. *Environmental science y technology*, 28(13), 2366-2371.
- Appenroth, K. J.** (2010). Definition of “heavy metals” and their role in biological systems. In *Soil heavy metals* (pp. 19-29). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Arce, M. I., von Schiller, D., y Gómez, R.** (2014). Variation in nitrate uptake and denitrification rates across a salinity gradient in Mediterranean semiarid streams. *Aquatic sciences*, 76(2), 295-311.
- Arif I. y Khan, H.** (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiv. Cons.* 32, 9-17.
- Armienta, M., Talavera, O. Morten y Barrera, M.** (2003). Geochemistry of metals from mine tailing in Taxco, México. *Bulletin of Environmental and Contaminant Toxicology* 72: 387-393 pp.
- Arroyo, Y. R. R., Ledesma, R. M. P., y Grabach, C. D. S.** (2004). Características geológicas y mineralógicas e historia de extracción del Distrito de Guanajuato, México. Posibles escenarios geoquímicos para los residuos mineros. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 21(2), 268-284.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances y Disease Registry.** (2009). Estudio de sustancias tóxicas (en línea) disponible en: [http://www.atsdr.cdr.gov/es/training/toxicology\\_curriculum/modules/4/es\\_lecturenotes.html](http://www.atsdr.cdr.gov/es/training/toxicology_curriculum/modules/4/es_lecturenotes.html) (consulta 4 de diciembre de 2017).
- Ballatori, N.** (2002). Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environmental health perspectives*, 110(5), 689-694.
- Bánfalvi, G.** (2011). Heavy metals, trace elements and their cellular effects. In *Cellular effects of heavy metals* (pp. 3-28). Springer, Dordrecht.
- Bank, M. S., Crocker, J., Connery, B., y Amirbahman, A.** (2007). Mercury bioaccumulation in green frog (*Rana clamitans*) and bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles from Acadia National Park, Maine, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 26(1), 118-125.
- Bank, M. S., Crocker, J., Connery, B., y Amirbahman, A.** (2007). Mercury bioaccumulation in green frog (*Rana clamitans*) and bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles from Acadia

- National Park, Maine, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 26(1), 118-125.
- Baqueiro-Cárdenas, E. R., Borabe, L., Goldaracena-Islas, C. G., y Rodríguez-Navarro, J.** (2007). Los moluscos y la contaminación: una revisión. *Revista mexicana de biodiversidad*, 78, 1-7.
- Bautista, F.** (1999). Introducción al Estudio de la Contaminación del Suelo por Metales Pesados. *Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México*. 109 pp.
- Beck, A. B.** (1956). The copper content of the liver and blood of some vertebrates. *Australian Journal of Zoology*, 4(1), 1-18.
- Beltrán, M. y Gómez, A.** (2015). Metales pesados (Cd, Cr y Hg): su impacto en el ambiente y posibles estrategias biotecnológicas para su remediación. *Revista I3*. 2(2). 82–112.
- Bhattacharya, T., Bhattacharya, S., Ray, A. K., y Dey, S.** (1989). Influence of industrial pollutants on thyroid function in *Channa punctatus* (Bloch). *Indian journal of experimental biology*, 27(1), 65-68.
- Blaustein, A. R., Wake, D. B., y Sousa, W. P.** (1994). Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation biology*, 8(1), 60-71.
- Blaustein, A. y Johnson, P.** (2003). The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in Ecology y the Environment* 1(2): 87-94.
- Bohn, H. L., McNeal, B. L., y O'Connor, G. A.** (2001). Acid soils. *Soil Chemistry. Third Edition. John Wiley and Sons, New York, NY*, 303, 48-66.
- Burkhart, J. G., Helgen, J. C., Fort, D. J., Gallagher, K., Bowers, D., Propst, T. L., y Lucier, G.** (1998). Induction of mortality and malformation in *Xenopus laevis* embryos by water sources associated with field frog deformities. *Environmental Health Perspectives*, 106(12), 841-848.
- Burlibaşa, L., y Gavrilă, L.** (2011). Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. *Applied Ecology and Environmental Research*, 9(1), 1-15.
- Campo, T. y Simanca Martínez, K., J.** (2019). Evaluación de las concentraciones de cadmio, plomo, zinc y cromo en especies ícticas del departamento de la Guajira-Colombia y riesgo de exposición en humanos (Tesis Doctoral, Universidad de la Costa).
- Canseco, M. L., y Gutiérrez, M. M. G.** (2010). Anfibios y reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *CONABIO. Fundación para la Reserva de la Biosfera Cuicatlán AC y Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Primera edición. México*, 56-57.
- Carr, J. A., y Patiño, R.** (2011). The hypothalamus–pituitary–thyroid axis in teleosts and amphibians: endocrine disruption and its consequences to natural populations. *General and Comparative Endocrinology*, 170(2), 299-312.
- Carréré, R.** (2004). Minería. *Impactos sociales y ambientales. Montevideo: Movimiento Mundial por los Bosques Tropicales*.
- Carrizales L., Jasso Y., Espinosa-Reyes G., Torres-Dosal A. y Díaz-Barriga F.** (2005). Diseño y aplicación de una metodología para la evaluación integrada de los riesgos ambientales en sitios peligrosos de México. Instituto Nacional de Ecología. México.
- Carvalho, C. S. y Fernandes, M. N.** (2006). Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*, 251(1), 109-117.
- Casas Andreu, G., López, V., y Bautista, R.** (1991). *Cómo hacer una colección de anfibios y reptiles* (No. C/598.1 C3).

- Castañeda-Bautista, J.** (2016). Estudio ecotoxicológico de los jales mineros de Huautla, Morelos: El caso *Pithecellobium dulce* (Rox.) Beth. (Fabaceae). Tesis de maestría. Centro de investigación en biodiversidad y conservación. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, México. 61p.
- Castro-Franco, R., Vergara-García, G. G., Bustos-Zagal, M. G., y Mena-Arizmendi, W.** (2006). Diversidad y distribución de anfibios del estado de Morelos, México. *Acta zoológica mexicana*, 22(1), 95-101.
- Cazenave, J., Nores, M. L., Miceli, M., Díaz, M.P., Wunderlin, D.A. y Bistoni, M.A.** (2008). Cambios en la actividad de natación y la actividad glutatión S-transferasa de *Jenynsia multidentata* alimentada con microcistina-RR. *Water research*, 42 (4-5), 1299-1307.
- Chapman, P. M., Wang, F., Janssen, C., Persoone, G., y Allen, H. E.** (1998). Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(10), 2221-2243.
- Clark, J. L., y Clements, W. H.** (2006). The use of in situ and stream microcosm experiments to assess population and community-level responses to metals. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(9), 2306-2312.
- CONANP.** (2005). Plan de manejo y conservación de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla. *Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas de la Semarnat*. México, D. F. 203 p.
- Cooke, A. S.** (1981). Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 25(2), 123-133.
- Córdoba, O. D. H., Herrera, F. C., y Melo, M. P.** (2013). Bioacumulación de mercurio en larvas de anuros en la zona afectada por la minería de oro en el río Dagua, Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2), 341-348.
- Cortés-Gómez, A. M., Ramírez-Pinilla, M. P. y Urbina-Cardona J.N.** (2015) *Protocolo para la medición de rasgos funcionales en anfibios. La ecología funcional como aproximación al estudio, manejo y conservación de la biodiversidad: protocolos y aplicaciones*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Crump, M. L., y Scott, N. Y.** (2004). Relevamientos por Encuentros Visuales. *Medición y Monitoreo de la Diversidad Biológica: Métodos Estandarizados para Anfibios. USA: Smithsonian Institution*, 84-92.
- Crump, M., L. y Rodríguez, L.O.** (2001). Los anfibios están desapareciendo de América Latina. Pp. 170–171. En R. Primack, R. Rozzi, P. Feinsinger, R. Dirzo y F. Massardo (Eds.), *Fundamentos de conservación biológica. Perspectivas latinoamericanas*. Fondo de Cultura Económica. Ciudad de México, México.
- Cruz-Elizalde, R., Ramírez-Bautista, A., Aguillón-Gutiérrez, D. R., Magno-Benítez, I., y Hernández-Austria, R.** (2017). Principales amenazas para la biodiversidad y perspectivas para su manejo y conservación en el estado de Hidalgo: El caso de los anfibios y reptiles. *Biodiversidad del Estado de Hidalgo*, 2, 577-590.
- Davutluoglu, O. I., Seckin, G., Ersu, C. B., Yilmaz, T., y Sari, B.** (2011). Heavy metal content and distribution in surface sediments of the Seyhan River, Turkey. *Journal of environmental management*, 92(9), 2250-2259.
- Delfín-Alcalá, I.** (2008). La microbiota presente en un desecho minero, como opción de restauración de jales. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: investigación, desarrollo y práctica*, 1 (4).

- Demichelis, S. O., De La Torre, F. R., Ferrari, L., Garcia, M. E., y Salibian, A.** (2001). Tadpoles assay: Its application to a water toxicity assessment of a polluted urban river. *Environmental monitoring and assessment*, 68(1), 63-73.
- Diario oficial de la federación (DOF).** (2011). Norma oficial mexicana, NOM-157-SEMARNAT-2009. Elementos y procedimientos para instrumentar planes de manejo de residuos mineros.
- Díaz Báez, M. C., Bustos López, M. C., y Espinosa Ramírez, A. J.** (2009). Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. *Ingeniería e Investigación*, 29(1), 142-142.
- Dickson, T. R.** (1980). *Química: enfoque ecológico* (No. QD31. 2. D52 1980.). Limusa.
- Dorado, O., B. Maldonado, D. M. Arias, V. Sorani, R. Ramírez, E. Leyva y D. Valenzuela.** (2005). *Programa de Conservación y Manejo Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla*. CONANP, México. 207 pp.
- Duellman, W. E.** (1999). *Patterns of distribution of amphibians: a global perspective*. JHU Press.
- Duellman, W. E., y Trueb, L.** (1986). *Biology of Amphibians* McGraw-Hill Book Company. *New York*.
- Duellman, W. E., y Trueb, L.** (1994). *Biology of Amphibians* –John Hopkins University Press. *Baltimore, London*.
- Eisler, R.** (2000). *Handbook of Chemical Risk Assessment: Health Hazards to Humans, Plants, and Animals, Three Volume Set*. CRC press.
- Eisler, R.** (2000). *Handbook of Chemical Risk Assessment: Health Hazards to Humans, Plants, and Animals, Three Volume Set* (Vol. 1). CRC press.
- Eligio-González, S.** (2017). Comunidades liquénicas asociadas a *Pithecellobium dulce*, *Acacia farnesiana* y *Prosopis laevigata* en jales mineros y sitios testigos en Huautla, Morelos. Maestría en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).
- Esteves, J. L., Solís, M., Sastre, V., Santinelli, N., Gil, M., Commendatore, M., y González Raies, C.** (1996). *Evaluación de la contaminación urbana de la Bahía San Antonio*. Fundación Patagonia Natural, Chubut (Argentina) Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica.
- Ezemonye, L., I. y Enuneku, A., A.** (2012). Hepatic bioaccumulation of cadmium in the crowned bullfrog, *Hoplobatrachus occipitalis* and flat backed toad, *Bufo maculatus*. *Int. J. of Aquatic Science*, 3(1), 15-22.
- Facemire, C. F., Gross, T. S., y Guillette Jr, L. J.** (1995). Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture?. *Environmental Health Perspectives*, 103(suppl 4), 79-86.
- Feinsinger, P.** (2001). *Designing field studies for biodiversity conservation*. Island Press.
- Fenoglio, C., Boncompagni, E., Fasola, M., Gandini, C., Comizzoli, S., Milanese, G., y Barni, S.** (2005). Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 259-268.
- Ferrer, A.** (2003). Intoxicación por plaguicidas. In *Anales del sistema sanitario de Navarra* (Vol. 26, pp. 155-171). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
- Ficken, K. L., y Byrne, P. G.** (2013). Heavy metal pollution negatively correlates with anuran species richness and distribution in south-eastern Australia. *Austral Ecology*, 38(5), 523-533.

- Forbes, T. L., y Forbes, V. E.** (1993). A critique of the use of distribution-based extrapolation models in ecotoxicology. *Functional ecology*, 7(3), 249-254.
- Fort, D. J., Rogers, R. L., Morgan, L. A., Miller, M. F., Clark, P. A., White, J. A., y Stover, E. L.** (2000). Preliminary validation of a short-term morphological assay to evaluate adverse effects on amphibian metamorphosis and thyroid function using *Xenopus laevis*. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 20(5), 419-425.
- Freda, J.** (1991). The effects of aluminum and other metals on amphibians. *Environmental Pollution*, 71(2-4), 305-328.
- Frost, D.** (2019). Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (Date of access). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- García, A., y Ceballos, G.** (1994). *Guía de campo de los reptiles y anfibios de la costa de Jalisco, México*. Fundación Ecológica de Cuixmala, AC.
- Gastelum, A., Aquino, A., y Aldama, L.** (2019). Efecto del cloruro de cadmio durante el desarrollo larvario de la rana toro *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). *Acta universitaria*, 29.
- Gochfeld, J. B. M.** (2000). Effects of lead on birds (Laridae): a review of laboratory and field studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, 3(2), 59-78. Can, J. (1995). Nasal cancer in leather workers: an occupational disease. *Journal of Cancer research y clinical Oncology*; 121:1-6.
- Gocht, W., H. Zantop y Eggert, G.** (1988). *International mineral economics*. Springer-Verlag, Berlin, 271 pp.
- González-Brito, A.** (2015). Efecto de un gradiente de contaminación por jales mineros sobre las comunidades de artrópodos asociado a la vegetación y con énfasis en el orden Araneae en Huautla, Morelos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del estado de Morelos, México. 82p.
- Gutiérrez, M.** (2003). Minería Unión de Grupos Ambientalistas (UGAM). Disponible en Internet en: <http://www.union.org.mx/guia/actividadesyagravios/mineria.htm>.
- Gutiérrez, M. E., y Moreno, M.** (1997). Los residuos en la minería mexicana. *INE, México*. Disponible en Internet en: [http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/35/los\\_residuos.html](http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/35/los_residuos.html).
- Gutiérrez, M. y Romero F.** (2015). Valoración del daño ambiental en la cuenca del río Sonora, asociado al derrame del 06 de agosto de 2014 de Buena Vista del Cobre. Memorias. XXXI Convención Internacional de Minería de la Asociación de Ingenieros de Minas, Metalurgistas y Geólogos de México, Acapulco, Guerrero, México, 7 al 10 de octubre, 604-616
- Gutiérrez-Ruiz, M., Romero, F. M., y González-Hernández, G.** (2007). Suelos y sedimentos afectados por la dispersión de jales inactivos de sulfuros metálicos en la zona minera de Santa Bárbara, Chihuahua, México. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 24(2), 170-184.
- Hall, R., J.** (1990). Accumulation, metabolism and toxicity of parathion in tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology;(USA)*, 44(4).
- Hall, R. J., y Mulhern, B., M.** (1984). Are anuran amphibians heavy metal accumulators?.

- Halliday, T. y Adler., K.** (2007). La gran enciclopedia de los anfibios y reptiles. Libsa, Madrid. 240.
- Hanson, L., y Ritter., L.** (2010). Toxicity y safety evaluation of pesticides. En: Krieger R (ed.) *Hayes' Hybook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, San Diego, USA pp 333-336.
- Henderson, P. y Seaby, R.** (2002). Species Diversity and Richness Ver. 3.0.3. Pisces Conservation Ltd., Lymington, Hampshire, UK
- Hernández-Gómez, M.** (2014). Estructura de la comunidad de microartrópodos a través de un gradiente de contaminación por metales pesados en Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias biológicas, Universidad Autónoma del estado de Morelos.
- Hernández-Lorenzo, B.** (2015). Análisis de la anatomía y morfología de *Prosopis laevigata* por acumulación de metales pesados en la sierra de Huautla, Morelos. Facultad de ciencias biológicas, UAEM.
- Herrera-Núñez, J., Rodríguez-Corrales, J., Coto-Campos, J. M., Salgado-Silva, V., y Borbón-Alpizar, H.** (2013). Evaluación de metales pesados en los sedimentos superficiales del río Pirro. *Revista Tecnología en Marcha*, 26(1), ág-27.
- Heyer, W. R., y Donnelly, M. A. C.** (2001). *Medición y monitoreo de la diversidad biológica: Métodos estandarizados para anfibios* (No. Gn3150). Editorial Universitaria de la Patagonia,.
- Hopkin, S. P.** (1993). Ecological implications of '95% protection levels' for metals in soil. *Oikos*, 137-141.
- Horne, M. T., y Dunson, W. A.** (1994). Exclusion of the Jefferson salamander, *Ambystoma jeffersonianum*, from some potential breeding ponds in Pennsylvania: effects of pH, temperature, and metals on embryonic development. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27(3), 323-330.
- Horne, M. T., y Dunson, W. A.** (1995). Effects of low pH, metals, and water hardness on larval amphibians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29(4), 500-505.
- Huang, H., Wang, Z., Xia, F., Shang, X., Liu, Y., Zhang, M. y Mei, K.** (2017). Water quality trend and change-point analyses using integration of locally weighted polynomial regression and segmented regression. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(18), 15827-15837.
- Ilizaliturri H., C. A.** (2010). Aplicación de una metodología de evaluación de riesgo ecológico en el sistema de humedales de Coatzacoalcos, Veracruz. *REPOSITORIO NACIONAL CONACYT*.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (INEGI).** (2009). Superficie de la República Mexicana por Estados. Publicación del instituto nacional de estadística geografía e información, México.
- Intamat, S., Phoonaploy, U., Sriuttha, M., Tengjaroenkul, B., y Neeratanaphan, L.** (2016). Heavy metal accumulation in aquatic animals around the gold mine area of Loei province, Thailand. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(6), 1418-1432.
- IPCS, WHO.** (1998). Environmental Health Criteria 61: Chromium. Geneva, World Health Organization.

- Jacobs, F. y Heyer, R.** (2001). Procesamiento de tejidos. Medición y Monitoreo de la diversidad biológica, métodos estandarizados para anfibios. Editorial Universitaria de la Patagonia, Argentina. 289-290 p.
- Jakimska, A., Konieczka, P., Skóra, K., y Namieśnik, J.** (2011). Bioaccumulation of Metals in Tissues of Marine Animals, Part I: the Role and Impact of Heavy Metals on Organisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 20(5).
- Jeziarska, B., y Witeska, M.** (2006). The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters. In *Soil and water pollution monitoring, protection and remediation* (pp. 107-114). Springer, Dordrecht.
- Jofré, M. B., Antón, R. I., y Caviedes-Vidal, E.** (2012). Lead and cadmium accumulation in anuran amphibians of a permanent water body in arid Midwestern Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(7), 2889-2897.
- Jofré, M. B., Caviedes-Vidal, E., y Cid, F. D.** (2010). Spatial and temporal patterns of richness and abundance in the anuran assemblage of an artificial water reservoir from the semiarid central region of Argentina. *Amphibia-Reptilia*, 31(4), 533-540.
- Jofré, M.B., R.I. Antón, Caviedes V. E.** (2012). Lead and cadmium accumulation in anuran amphibians of a permanent water body in arid Midwestern Argentina. *Environmental Science and Pollution Research* 19:2889–2897.
- Jorgensen, S.** (2016). *Introduction to systems ecology*. CRC Press. Copenhagen University, Denmark. 326 pp.
- Kabas, S., Faz, A., Acosta, J. A., Arocena, J. M., Zornoza, R., Martínez-Martínez, S., y Carmona, D. M.** (2014). Marble wastes and pig slurry improve the environmental and plant-relevant properties of mine tailings. *Environmental geochemistry and health*, 36(1), 41-54.
- Krebs, C. J.** (1989). *Ecological methodology*. Harper Collins Publ. 654.
- Kuang, C., Shan, Y., Gu, J., Shao, H., Zhang, W., Zhang, Y., y Liu, H.** (2016). Assessment of heavy metal contamination in water body and riverbed sediments of the Yanghe River in the Bohai Sea, China. *Environmental Earth Sciences*, 75(14), 1105.
- Laino-Guanes, R. M., Bello-Mendoza, R., González-Espinosa, M., Ramírez-Marcial, N., Jiménez-Otárola, F., y Musálem-Castillejos, K.** (2015). Concentración de metales en agua y sedimentos de la cuenca alta del río Grijalva, frontera México-Guatemala. *Tecnología y ciencias del agua*, 6(4), 61-74.
- Lefcort, H., Meguire, R. A., Wilson, L. H. y Ettinger, W. F.** (1998). Heavy metals alter the survival, growth, metamorphosis, and antipredatory behavior of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35(3), 447-456.
- Lefcort, H., Meguire, R. A., Wilson, L. H. y Ettinger, W. F.** (1998). Heavy metals alter the survival, growth, metamorphosis, and antipredatory behavior of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35(3), 447-456.
- Leuven, R. S. E. W., Den Hartog, C., Christiaans, M. M. C. y Heijligers, W. H. C.** (1986). Effects of water acidification on the distribution pattern and the reproductive success of amphibians. *Experientia*, 42(5), 495-503.
- Leynaud, G.C., Pelegrin N. y Lescano J. N.** (2006) Amphibians and reptiles. In: Bucher EH (ed) Bañados del río Dulce y laguna Mar Chiquita (Córdoba, Argentina). Academia Nacional de Ciencias, Córdoba, pp 219–235.

- Li, Y., Arocena, J. M., Zhang, Q., Thring, R. W. y Li, J.** (2017). Heavy metals and nutrients (carbon, nitrogen, and phosphorus) in sediments: relationships to land uses, environmental risks, and management. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(8), 7403-7412.
- Licht, L. E.** (1976). Postmetamorphic retention of C14DDT by wood frog tadpoles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 55(2), 119-121.
- Liu, Y., Peng, Y., Yue, D., Yin, Q. y Xiao, L.** (2015). Assessment of heavy metal enrichment, bioavailability, and controlling factors in sediments of Taihu Lake, China. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 24(3), 262-275.
- Loh, P. S., Chen, C. T. A., Anshari, G. Z., Lou, J. Y., Wang, J. T., Wang, S. L. y Wang, B. J.** (2016). Sedimentary organic matter and phosphate along the Kapuas River (west Kalimantan, Indonesia). *Journal of Chemistry*, 2016.
- Londoño-Franco, L. F., Londoño-Muñoz, P. T. y Muñoz-García, F. G.** (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Bioteología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145-153.
- López de Romaña, D., Castillo, C., y Diazgranados, D.** (2010). El zinc en la salud humana-1. *Revista chilena de nutrición*, 37(2), 234-239.
- López Noguera, M.** (2015). Actividad minera en el choco biogeográfico y su impacto en anfibios. Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de ingeniería. 18p.
- Lottermoser, B. G.** (2010). Mine wastes: Characterization, treatment an environmental impacts. Third Edition. Springer, Berlin, Heidelberg, 400p.
- Luck, G. W., Lavorel, S., McIntyre, S. y Lumb, K.** (2012). Improving the application of vertebrate trait-based frameworks to the study of ecosystem services. *Journal of Animal Ecology*, 81(5), 1065-1076.
- Luoma, S. N.** (1989). Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements. In *Sediment/Water Interactions* (pp. 379-396). Springer, Dordrecht.
- Mackay, D., y Clark, K. E.** (1991). Predicting the environmental partitioning of organic contaminants and their transfer to biota. In *Organic contaminants in the environment* (pp. 159-188). Springer, Dordrecht.
- Maes, G. E., Raeymaekers, J. A. M., Pampoulie, C., Seynaeve, A., Goemans, G., Belpaire, C., y Volckaert, F. A. M.** (2005). The catadromous European eel *Anguilla anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability. *Aquatic toxicology*, 73(1), 99-114.
- Magnusson, B.** (2014). The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics (2014).
- Magurran, A. E.** (1988). *Ecological diversity and its measurement*. Princeton university press.
- Mann, R. M., Hyne, R. V., Choung, C. B. y Wilson, S. P.** (2009). Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental pollution*, 157(11), 2903-2927.
- Mariani, C. F., y Pompêo, M. L.** (2008). Potentially bioavailable metals in sediment from a tropical polymictic environment—Rio Grande Reservoir, Brazil. *Journal of Soils and Sediments*, 8(5), 284.
- Marques, S. M., Antunes, S. C., Pissarra, H., Pereira, M. L., Gonçalves, F. y Pereira, R.** (2009). Histopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in Iberian green frogs (*Rana perezi* Seoane) from a uranium mine pond. *Aquatic Toxicology*, 91(2), 187-195.
- Marques, S. M., Gonçalves, F., y Pereira, R.** (2008). Effects of a uranium mine effluent in the early-life stages of *Rana perezi* Seoane. *Science of the total environment*, 402(1), 29-35.

- Martínez, M. S.** (2014). Bioacumulación y daño genotóxico en *Acacia farnesiana* (L.) Willd. por metales pesados en los jales de Huautla. Departamento de Sistemática y Evolución, Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
- Martínez-Becerril, C.** (2009). Efecto de los metales pesados en jales mineros sobre la comunidad vegetal de la microcuenca Huautla y el daño genotóxico en su herbívoro dominante *Peromyscus levipes* (Rodentia: Muridae). Tesis de Maestría en Gestión integral de Cuencas. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma del Estado de Querétaro. 108 p.
- McGregor, A. J. y Mason, H. J.** (1991). Occupational mercury vapour exposure and testicular, pituitary and thyroid endocrine function. *Human y experimental toxicology*, 10(3), 199-203.
- Mead, M., N.** (2011). Confusión por el cadmio ¿Los consumidores necesitan protección? *Salud Pública de México*, 53, 178-186.
- Medina, M. H., Correa, J. A. y Barata, C.** (2007). Micro-evolution due to pollution: possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere*, 67(11), 2105-2114.
- Mendenhall, C. D., Frishkoff, L. O., Santos-Barrera, G., Pacheco, J., Mesfun, E., Quijano, F. M. y Pringle, R. M.** (2014). Countryside biogeography of Neotropical reptiles and amphibians. *Ecology*, 95(4), 856-870.
- Méndez-Ramírez, M. y Armienta Hernández, M. A.** (2012). Distribución de Fe, Zn, Pb, Cu, Cd y As originada por residuos mineros y aguas residuales en un transecto del Río Taxco en Guerrero, México. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 29(2), 450-462.
- Mero, M., Pernía, B., Ramírez-Prado, N., Bravo, K., Ramírez, L., Larreta, E. y Montenegro, F. E.** (2019). Concentración de cadmio en agua, sedimentos, *Eichhornia crassipes* Y *Pomacea canaliculata* en el río Guayas (Ecuador) y sus afluentes. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35(3), 623-640.
- Meybeck, M., Lestel, L., Bonté, P., Moilleron, R., Colin, J. L., Rousselot, O. y Thévenot, D. R.** (2007). Historical perspective of heavy metals contamination (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) in the Seine River basin (France) following a DPSIR approach (1950–2005). *Science of the Total Environment*, 375(1-3), 204-231.
- Mitchell, S. E., Caldwell, C. A., Gonzales, G., Gould, W. R., y Arimoto, R.** (2005). Effects of depleted uranium on survival, growth, and metamorphosis in the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 68(11-12), 951-96.
- Moreno, C. E.** (2001). Métodos para medir la biodiversidad. MyT–Manuales y Tesis SEA, vol. 1. Zaragoza, 84(922495), 2.
- Morínigo, E. G. M.** (2016). *Ecotoxicología en anfibios: un análisis cuantitativo* (Bachelor's thesis).
- Muñoz-Escobar, E. M., y Palacio-Baena, J. A.** (2010). Efectos del cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) sobre la sobrevivencia y crecimiento de renacuajos de *Dendrosophus bogerti*. *Actualidades biológicas*, 32(93), 189-197.
- Murillo, H.** (2015). Detección de daño genotóxico en *Prosopis laevigata* de los jales de Sierra de Huautla, Morelos, México, provocado por metales pesados. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 66p.
- Mussali-Galante, P.** (2008). Estudio sobre la inducción de daño al ADN en sangre periférica de individuos expuestos a metales en al agua de bebida, en la población de Huautla, Morelos (Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México).

- Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M., Valencia-Cuevas, L., y Rojas, E.** (2013). Evidence of population genetic effects in *Peromyscus melanophrys* chronically exposed to mine tailings in Morelos, Mexico. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(11), 7666-7679.
- Natale, G. S., Ronco, A. E. y Basso, N. G.** (2006). Análisis ecotoxicológico de una comunidad de anuros de la Región Pampeana: Efecto del Cr [VI] sobre embriones y larvas de distintas especies de una taxocomunidad.
- Naujokas, M. F., Anderson, B., Ahsan, H., Aposhian, H. V., Graziano, J. H., Thompson, C., y Suk, W. A.** (2013). The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. *Environmental health perspectives*, 121(3), 295-302.
- Navarro-Aviñó, J. P., Alonso, I. A., y López-Moya, J. R.** (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Revista Ecosistemas*, 16(2).
- Nava-Ruíz, C. y Méndez-Armenta, M.** (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Arch Neurocién (Mex)*, 16(3), 140-147.
- Navas, C. A., Jared, C. y Antoniazzi, M. M.** (2002). Water economy in the casque-headed tree-frog *Corythomantis greeningi* (Hylidae): role of behaviour, skin, and skull skin ossification. *Journal of Zoology*, 257(4), 525-532.
- Negret, B. E. S.** (2016). *La ecología funcional como aproximación al estudio, manejo y conservación de la biodiversidad: protocolos y aplicaciones*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Newman, M. C.** (2014). *Fundamentals of ecotoxicology: the science of pollution*. CRC press.
- Newman, M. C. y Unger, M. A.** (2003). *Fundamentals of ecotoxicology* Lewis Publishers. Boca Raton, Florida, 458.
- Nixon, M. y Mangold, K.** (1998). The early life of *Sepia officinalis*, and the contrast with that of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda). *Journal of Zoology*, 245(4), 407-421.
- Nordberg, G.** (2017). Metales: Propiedades químicas y toxicidad productos químicos. Vol. II. *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT)*.
- Núñez-Colín, C. A.** (2018). Análisis de varianza no paramétrica: un punto de vista a favor para utilizarla. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 4(3), 69-79.
- Ocampo-Díaz, Y. Z. E., Pinzon-Sotelo, M. P., Chávez-Cabello, G., Ramírez-Díaz, A., Martínez-Paco, M., Velasco-Tapia, F. y Barboza-Gudiño, J. R.** (2016). Propuesta nomenclatural y análisis de procedencia de la Formación Concepción del Oro (antes Formación Caracol): implicaciones sobre la evolución tectónica del sur de Norteamérica durante el Cretácico Tardío. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 33(1), 3-33.
- Ortiz-Romero, L. T., Delgado-Tascón, J. G., Pardo-Rodríguez, D. A., Perea, E. M. y Duque, A. J. G.** (2015). Determinación de metales pesados e índices de calidad en aguas y sedimentos del Río Magdalena-Tramo Tolima, Colombia. *Revista Tumbaga*, 2(10), 43-61.
- Palacio-Baena, J.** (2007). *Ecotoxicología acuática*. Universidad de Antioquia. Primera edición, Medellín: Imprenta Universidad de Antioquia. p. 85-86.
- Pan, L., Wang, Y., Ma, J., Hu, Y., Su, B., Fang, G. y Xiang, B.** (2018). A review of heavy metal pollution levels and health risk assessment of urban soils in Chinese cities. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(2), 1055-1069.
- Pansonato, A., Mott, T. y Strüssmann, C.** (2011). Anuran amphibians' diversity in a northwestern area of the Brazilian Pantanal. *Biota Neotropica*, 11(4), 77-86.

- Papadimitriou, E. A. y Loumbourdis, N. S.** (2003). Copper kinetics and hepatic metallothionein levels in the frog *Rana ridibunda*, after exposure to CuCl<sub>2</sub>. *Biometals*, 16(2), 271-277.
- Parejo, C. y Parejo, J.** (2012). La minería metálica en el mundo. El caso particular de extremadura en la agricultura y la ganadería extremeñas. En: La agricultura y la ganadería extremeñas. *Caja Badajoz*. España. 103-118 p.
- Park, C. J., Ahn, H. M. y Gye, M. C.** (2012). Effects of Heavy Metals on Amphibian Embryos, Tadpoles, and Adults. *Korean Journal of Environmental Biology*, 30(4), 287-306.
- Patrignani, A. y Ochsner, T. E.** (2015). Canopeo: A powerful new tool for measuring fractional green canopy cover. *Agronomy Journal*, 107(6), 2312-2320.
- Pechmann, J. H. y Wilbur, H. M.** (1994). Putting declining amphibian populations in perspective: natural fluctuations and human impacts. *Herpetologica*, 65-84.
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Sanchez, L. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Bionda, C. L., y Basso, A.** (2011). Morphological abnormalities in amphibian populations. *Herpetological Conservation and Biology*, 6(3), 432-442.
- Penicaud, V., Lacoue-Labarthe, T. y Bustamante, P.** (2017). Metal bioaccumulation and detoxification processes in cephalopods: a review. *Environmental research*, 155, 123-133.
- Pérez-García, P., E., Azcona-Cruz, M., I.** (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 17(3), 199-205.
- Phillips, D. H., y Arlt, V. M.** (2009). Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. In *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* (pp. 87-110). Birkhäuser Basel.
- Pollard, A. I., y Yuan, L.** (2006). Community response patterns: evaluating benthic invertebrate composition in metal-polluted streams. *Ecological Applications*, 16(2), 645-655.
- Prafulla, V.** (2002). Investigations on the distribution characteristics of heavy metals in squid (*Loligo Spp.*) in relation to levels in food fishes from the west coast of India with a perspective on seafood safety.
- Puga, S., Sosa, M., Mora, A. D. L., Pinedo, C. y Jiménez, J.** (2006). Concentraciones de As y Zn en vegetación nativa cercana a una presa de jales. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 22(2), 75-82.
- Putshaka, J. D., Akyengo, O., Yakubu, A.** (2015). Bioaccumulation of heavy metals in fish (*Tilapia zilli*) and bullfrog (*Pyxicephalus edulis*) from River Challawa Kano State Nigeria. *AASCIT* 2:30-4.
- Qu, L., Huang, H., Xia, F., Liu, Y., Dahlgren, R. A., Zhang, M. y Mei, K.** (2018). Risk analysis of heavy metal concentration in surface waters across the rural-urban interface of the Wen-Rui Tang River, China. *Environmental pollution*, 237, 639-649.
- Rahimi, E.** (2013). Lead and cadmium concentrations in goat, cow, sheep, and buffalo milks from different regions of Iran. *Food chemistry*, 136(2), 389-391.
- Rahman, M. A., Hasegawa, H. y Lim, R. P.** (2012). Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. *Environmental research*, 116, 118-135.
- Ramos-Arroyo Y., Prol-Ledesma R. y Siebe-Grabach C.** (2004). Características geológicas y mineralógicas e historia de extracción del distrito de Guanajuato, México. Posibles escenarios geoquímicos para los residuos mineros. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*. 21: 268-284.
- Ramos-Arroyo, Y., R. y Siebe-Grabach, C. D.** (2006). Estrategia para identificar jales con potencial de riesgo ambiental en un distrito minero: estudio de caso en el Distrito de Guanajuato, México. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 23(1), 54-74.

- Relyea, R. A.** (2005). The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(3), 351-357.
- Reques, R.** (2008). Establecimiento de nuevos micro-humedales en el Corredor Verde del Río Guadamar para la conectividad de poblaciones de anfibios. Pages 415-424 in Restauración Ecológica del Río Guadamar y el Proyecto del Corredor Verde. La Historia de un Paisaje Emergente. CMA J. Andalucía
- Reyna-Rosas, E.** (2009). Evaluación de los cambios nucleares en el epitelio bucal de individuos expuestos a metales en el agua de bebida de Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 73p.
- Reza, R. y Singh, G.** (2010). Heavy metal contamination and its indexing approach for river water. *International Journal of Environmental Science y Technology*, 7(4), 785-792.
- Ridolfi Engineers y Associates Inc.** (1993). Ridolfi Eng and Assoc, Inc. Seattle, WA
- Rodríguez, H. R.** (2006). Contaminación de sedimentos del Rio Anoaia por metales pesados (Barcelona-España). *Revista Investigación y Desarrollo*, 1(5).
- Rodríguez, M.** (2020). Elementos potencialmente tóxicos en el polvo urbano de la zona metropolitana de San Luis Potosí (Tesis de Maestría). Instituto Potosino De Investigación Científica Y Tecnológica, A.C.
- Roldán, N.** (2017). Bioacumulación y biomagnificación de elementos potencialmente tóxicos en el pulpo *Octopus hubbsorum* del puerto minero de santa Rosalía del Golfo de California. Instituto Politécnico Nacional. Centro interdisciplinario de ciencias marinas. Tesis de maestría.
- Rolf, A., y Hediger, M. A.** (1999). Metal ion transporters in mammals: structure, function and pathological implications. *The Journal of Physiology*, 518(1), 1-12.
- Rowe, C. L., Kinney, O. M., Fiori, A. P. y Congdon, J. D.** (1996). Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth.
- Rowe, C., Kinney, O., Fiori, A. y Congdon, J.** (1996). Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. *Freshwater Biology*, 36(3), 723-730.
- Rueda-Almonacid, J. V.** (1999). Anfibios y reptiles amenazados de extinción en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 23, 475-498.
- Ruiz, F.** (2001). Trace metals in estuarine sediments from the southwestern Spanish coast. *Marine Pollution Bulletin*, 42(6), 481-489.
- Rzedowski, J.** (2006). Vegetación de México. 1ra edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. *México, DF, México*.
- Salas-Megchún, E. F.** (2014). Geoquímica y mineralogía de jales en mina Aurora, Xichú, Guanajuato (tesis para obtener el grado de maestro en Ciencias de la Tierra). *Universidad Nacional Autónoma de México: México*.
- Samways, J.** (1994). Insect conservation Biology. Chapman y Hall, London.
- Sánchez-Bain, A., Forget, G., Feola, G. y Ronco, A.** (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones.
- Sasa, M., y Bolaños, F.** (2004). Biodiversity and conservation of Mesoamerican dry-forest herpetofauna. *Biodiversity conservation in Costa Rica: Learning the lessons in a seasonal*

- dry forest. Frankie, GW, A. Mata and SB Vinson (Eds.). University of California Press, Berkeley, 177-193.*
- Schieber, M. y Chandel, N. S.** (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, 24(10), R453-R462.
- Scott, N. y Woodward B.** (2001). Relevamientos de lugares de reproducción. En *Medición y monitoreo de la diversidad biológica, métodos estandarizados para anfibios*, W. R. Heyer, M. A. Donnelly, R.W. McDiarmid, C. Hayek y M. S. Foster (eds.). Editorial Universitaria de la Patagonia. p. 113-117.
- Secretaría de Economía (SE).** (2020). Minería. <https://www.gob.mx/se/acciones-y-programas/mineria>. Fecha de consulta: 14-abril-2018.
- Selvi, M., Gül, A. y Yilmaz, M.** (2003). Investigation of acute toxicity of cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>· H<sub>2</sub>O) metal salt and behavioral changes it causes on water frog (*Rana ridibunda* Pallas, 1771). *Chemosphere*, 52(1), 259-263.
- SEMARNAT.** (2000). Identificación y Caracterización de Sitios Contaminados con Residuos Peligrosos. 19 Pág. Información proporcionada por la Dirección General de Gestión Integral de Materiales y Actividades Riesgosas. INE, México.
- SEMARNAT.** (2006). Muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales y metaloides, y manejo de la muestra NMX-AA-132-SCFI-2006.
- Severtsova, E. A., Aguillón-Gutierrez, D. y Severtsov, A. S.** (2012a). Frequent anomalies in larvae of common and moor frogs in Moscow area and in the Suburbs of Moscow, Russia. *Russian Journal of Herpetology*, 19(4), 337-348.
- Severtsova, E. A., Aguillón-Gutiérrez, D. y Severtsov, A. S.** (2012b). Morphometry as a method of studying adaptive regulation of embryogenesis in polluted environments. In *Embryogenesis*. IntechOpen.
- Severtsova, E. A., Nikiforova, A. I., y Aguillón-Gutierrez, D.** (2013). Spectrochemical and histochemical analyses of tissues of grass frog and gray toad tadpoles developing under simulation of pollution by plumbum and ferrum. *Moscow University biological sciences bulletin*, 68(4), 186-191.
- Severtsova, E. A. y Aguillón-Gutierrez, D.** (2013). Postembryonic development of anurans in ponds littered with metal-containing refuse (simulation experiments). *Biology Bulletin*, 40(9), 738-747.
- Shapiro, S. S. y Wilk, M. B.** (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611.
- Shomar, B.** (2009). Sources and build up of Zn, Cd, Cr and Pb in the sludge of Gaza. *Environmental monitoring and assessment*, 155(1-4), 51-62.
- Siegel, S. y John Jr, N. Castellan.** (1988). *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*.
- Simpson, E. H.** (1949). Measurement of diversity. *nature*, 163(4148), 688-688.
- Sin, Y. M. y Teh, W. F.** (1992). Effect of long-term uptake of mercuric sulphide on thyroid hormones and glutathione in mice. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 49(6), 847-854.
- Skoog, D. A., Holler, F. J. y Crouch, S. R.** (2008). Principios de análisis instrumental 6ta edición. Ed. Cengage Learning Editores. México DF.
- Slooff, W. y Baerselman, R.** (1980). Comparison of the usefulness of the mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) and the clawed toad (*Xenopus laevis*) in toxicological bioassays. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 24(1), 439-443.

- Smith, E. P. y Cairns, J.** (1993). Extrapolation methods for setting ecological standards for water quality: statistical and ecological concerns. *Ecotoxicology*, 2(3), 203-219.
- SNL Metals y mining.** (2016). World exploration trends. 12 p.
- Solís, M. M.** (2016). Aislamiento de bacterias de jales mineros y análisis de su potencial para la remediación de sitios contaminados con metales pesados. Tesis de maestría. Centro de investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del estado de Morelos. 106p.
- Solow, A. R.** (1993). Estimating record inclusion probability. *The American Statistician*, 47(3), 206-208.
- Sonter, L. J., Ali, S. H. y Watson, J. E. M.** (2018). Mining and biodiversity: Key issues and research needs in conservation science. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1926>.
- Sparling, D. W., Bishop, C. A. y Linder, G.** (2000). The current status of amphibian and reptile ecotoxicological research.
- Sparling, D. W., Krest, S., y Ortiz-Santaliestra, M.** (2006). Effects of lead-contaminated sediment on *Rana sphenoccephala* tadpoles. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 51(3), 458.
- Sparling, D. W. y Lowe, T. P.** (1996). Metal concentrations of tadpoles in experimental ponds. *Environmental Pollution*, 91(2), 149-159.
- Sparling, D. y Fellers, G.** (2007). Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion y their oxon derivatives to larval *Rana boylei*. *Environmental Pollution* 147:535–539.
- Spisto, G.** (1989). The chemistry of soils (p. 277).
- Statsoft, S.** (2007). 8.0, 2300 East 14 th St. *Tulsa, OK, 74104*, 1984-2007.
- Stolyar, O. B., Loumbourdis, N. S., Falfushinska, H. I. y Romanchuk, L. D.** (2008). Comparison of metal bioavailability in frogs from urban and rural sites of Western Ukraine. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 54(1), 107-113.
- Stolyar, O. B., Loumbourdis, N. S., Falfushinska, H. I. y Romanchuk, L. D.** (2008). Comparison of metal bioavailability in frogs from urban and rural sites of Western Ukraine. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 54(1), 107-113.
- Stolyar, O. B., Mykhayliv, R. L. y Mishchuk, Y. V.** (2004). Influence of the environmental conditions on binding of heavy metals and oxidative decomposition of biomolecules in tissues of *Anodonta cygnea* (Bivalvia). *Hydrobiological Journal*, 40(2).
- Strayer, D. L., May, S. E., Nielsen, P., Wollheim, W. y Hausam, S.** (1997). Oxygen, organic matter, and sediment granulometry as controls on hyporheic animal communities. *Archiv für Hydrobiologie*, 140(1), 131-144.
- Suárez, V. R., Mercado-Silva, N., García, C. P. y Dávalos, L. I. I.** (2016). Anurans of the Marabasco River, new records for the state of Colima, Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 61(3), 241-246.
- Suazo-Ortuño, I., Alvarado-Díaz, J. y Martínez-Ramos, M.** (2008). Effects of conversion of dry tropical forest to agricultural mosaic on herpetofaunal assemblages. *Conservation biology: the journal of the Society for Conservation Biology*, 22(2), 362.
- Sutherland, R. A.** (2000). Bed sediment-associated trace metals in an urban stream, Oahu, Hawaii. *Environmental geology*, 39(6), 611-627.
- Sutherland, Ross A.** (1998). “Loss-on-Ignition Estimates of Organic Matter and Relationships to Organic Carbon in Fluvial Bed Sediments.” *Hydrobiologia* 389(1–3):153–67.
- Sztrum, A. A.** (2010). *Susceptibilidad diferencial al níquel en distintos estadios del desarrollo embrio-larval de Rhinella (Bufo) arenarum* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).

- Tang, W., Zhang, C., Zhao, Y., Shan, B. y Song, Z.** (2017). Pollution, toxicity, and ecological risk of heavy metals in surface river sediments of a large basin undergoing rapid economic development. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(5), 1149-1155.
- Terlien, M. T.** (1998). The determination of statistical and deterministic hydrological landslide-triggering thresholds. *Environmental geology*, 35(2-3), 124-130.
- Thanomsangad, P., Tengjaroenkul, B., Sriuttha, M. y Neeratanaphan, L.** (2019). Heavy metal accumulation in frogs surrounding an e-waste dump site and human health risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 1-16.
- Theodorakis, C. W., Swartz, C. D., Rogers, W. J., Bickham, J. W., Donnelly, K. C. y Adams, S. M.** (2000). Relationship between genotoxicity, mutagenicity, and fish community structure in a contaminated stream. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 7(2), 131-143.
- Thévenot, D. R., Moilleron, R., Lestel, L., Gromaire, M. C., Rocher, V., Cambier, P. y Meybeck, M.** (2007). Critical budget of metal sources and pathways in the Seine River basin (1994–2003) for Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb and Zn. *Science of the total environment*, 375(1-3), 180-203.
- Thomas, C. A. y Bendell-Young, L. I.** (1998). Linking the sediment geochemistry of an intertidal region to metal bioavailability in the deposit feeder *Macoma balthica*. *Marine Ecology Progress Series*, 173, 197-213.
- Tiwari, S., Tripathi, I. P. y Tiwari, H. L.** (2014). Blood lead level-a review. *International Journal of Scientific Engineering and Technology*, 3(4), 330-333.
- Torres, A., Espinosa-Reyes, G., Ilizaliturri, C., González, D. J., Razo, I., Mejía, J. y Díaz-Barriga, F.** (2005). Diseño y aplicación de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios peligrosos de México. *Instituto Nacional de Ecología. San Luis Potosí, México*.
- Tovar-Sánchez, E., Cervantes, L. T., Martínez, C., Rojas, E., Valverde, M., Ortiz-Hernández, M. L. y Mussali-Galante, P.** (2012). Comparison of two wild rodent species as sentinels of environmental contamination by mine tailings. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(5), 1677-1686.
- Tovar-Sánchez, E., Mussali-Galante, Pacheco P., Hernández, M. M., Salinas, M. L. O. y Velona, A. O.** (2016). Relationship between genotoxic damage and arsenic blood concentrations in individuals residing in an arsenic contaminated area in Morelos, Mexico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 32(1), 101-117.
- Urbina, J. M., Jagoe, C. H., Hopkins, W. A. y Brant, H. A.** (2004). Adverse effects of ecologically relevant dietary mercury exposure in southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*) larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(12), 2964-2970.
- Urbina-Cardona, J. N., Navas, C. A., González, I., Gómez-Martínez, M. J., Llano-Mejía, J., Medina-Rangel, G. F. y Blanco-Torres, A.** (2014). Determinantes de la distribución de los anfibios en el bosque seco tropical de Colombia: herramientas para su conservación. *el bosque seco tropical en Colombia ii. Biodiversidad asociada al bosque seco*, 163-189.
- Urbina-Cardona, J. N. y Londoño, M. C.** (2003). Distribución de la comunidad de herpetofauna asociada a cuatro áreas con diferente grado de perturbación en la Isla Gorgona, Pacífico colombiano. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 27(102), 105-114.

- Vaira, M.** (2002). Anurans of a subtropical montane forest in northwestern Argentina: ecological survey and a proposed list of species of conservation concern. *Biodiversity y Conservation*, 11(6), 1047-1062.
- Velasco J., De la Rosa D., Ramírez M. y Volke T.** (2005). Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales Etapa II. SEMARNAT-INE. México. 46 pp.
- Venturino, A., Rosenbaum, E., Caballero De Castro, A., Anguiano, O. L., Gauna, L., Fonovich De Schroeder, T. y Pechen De D'Angelo, A. M.** (2003). Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers*, 8(3-4), 167-186.
- Villalobos, V., Hernandez-Fonseca, J. P., Bonilla, E., Medina-Leendertz, S., Mora, M. y Mosquera, J.** (2015). Alteraciones ultraestructurales del núcleo caudado de ratones tratados con manganeso. *Investigación Clínica*, 56(S1), 621-623.
- Villareal, H. M., Álvarez, M., Córdoba-Córdoba, S., Escobar, F., Fagua, G., Gast, F. y Umaña, A. M.** (2004). Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad.
- Villela, O. A. F., Quijano, F. M. y Porter, G. G.** (1995). *Recopilación de Claves Para la Determinación de Anfibios Y Reptiles de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología.
- Vitt, L. J., y Caldwell, J. P.** (2013). *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. Academic press.
- Volke, S. T., Velasco, T. A., De la Rosa, P. A. y Solórzano, O. G.** (2004). Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. *Etapa I. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Mexico*.
- Vosjoli, P.** (2012). *Popular Amphibians*. Herpetocultural library. Singapore.
- Wells, K. D.** (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press, USA.
- Woodall, C., Maclean, N. y Crossley, F.** (1988). Responses of trout fry (*Salmo gairdneri*) and *Xenopus laevis* tadpoles to cadmium and zinc. *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology*, 89(1), 93-99.
- Zar, J. H.** (2010). *Biostatistical analysis/By Jerrold H. Zar* (No. 574.0182 Z3.).
- Zhong, H., Kraemer, L. y Evans, D.** (2012). Effects of aging on the digestive solubilization of Cu from sediments. *Environmental pollution*, 164, 195-203.
- Zhong, H., Kraemer, L. y Evans, D.** (2013). Influence of contact time and sediment composition on the bioavailability of Cd in sediments. *Environmental pollution*, 173, 11-16.
- Zhong, H. y Wang, W. X.** (2006a). Influences of aging on the bioavailability of sediment-bound Cd and Zn to deposit-feeding sipunculans and soldier crabs. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(10), 2775-2780.
- Zhong, H. y Wang, W. X.** (2006b). Sediment-bound inorganic Hg extraction mechanisms in the gut fluids of marine deposit feeders. *Environmental science y technology*, 40(19), 6181-6186.
- Zhong, H., y Wang, W. X.** (2009). The role of sorption and bacteria in mercury partitioning and bioavailability in artificial sediments. *Environmental pollution*, 157(3), 981-986.

## Anexo fotográfico



*Rhinella horribilis*, Linnaeus 1798



*Incilius perplexus*, Taylor 1943



*Smilisca baudinii*, Duméril y Bibron 1841



*Agalychnis dacnicolor*, Cope 1864



*Tlalocohyla smithii*, Boulenger 1902



*Lithobates spectabilis*, Hillis y Frost 1985



*Lithobates zweifeli*, Hillis, Frost y Webb 1984



*Hypopachus variolosus*, Cope 1866



*Dryophytes arenicolor*, Cope 1866



Cuernavaca, Morelos, a 22 de enero de 2020



**Comisión de Seguimiento Académico  
Maestría en Biología Integrativa de la  
Biodiversidad y la Conservación**

**Presente**

Como integrante del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada "Análisis ecotoxicológico de comunidades de anuros que habitan áreas cercanas a un jal minero en Sierra de Huautla" del alumno Biól. **Eduardo Aarón Chávez Ramírez**, con número de matrícula **10012895**, aspirante al grado de Maestro en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, considero que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado. Por lo tanto emito mi **VOTO APROBATORIO**.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente

**Dr. César Arturo Ilizaliturri Hernández**  
PITC B

Profesor Investigador Tiempo Completo  
Coordinador del Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud  
(CIAAS)

Tel.: 01444 8 26 23 00; ext 8463

e-mail: cesar.ilizaliturri@uaslp.mx; ilizaliturri\_ca@hotmail.com

Web: <http://ecorisk.wordpress.com/about/>



**FACULTAD DE  
MEDICINA  
UASLP  
CIAAS**

[www.uaslp.mx](http://www.uaslp.mx)

Av. Venustiano Carranza 2405  
CP 78210 - San Luis Potosí, S.L.P.  
tel. (444) 826 2344 al 49  
tel. Dirección (444) 826 2350  
fax (444) 826 2352



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN

Cuernavaca, Morelos a 27 de abril de 2020

**Comisión de Seguimiento Académico  
Maestría en Biología Integrativa de la  
Biodiversidad y la Conservación**

**Presente**

Como integrante del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada "**Análisis ecotoxicológico de comunidades de anuros que habitan áreas cercanas a un jal minero en Sierra de Huautla**" del alumno **Biól. Eduardo Aarón Chávez Ramírez**, con número de matrícula **10012895**, aspirante al grado de Maestro en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, considero que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dr. Efraín Tovar Sánchez

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209  
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 7019

**UA  
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN

Cuernavaca, Morelos, a 24 de enero de 2020

**Comisión de Seguimiento Académico  
Maestría en Biología Integrativa de la  
Biodiversidad y la Conservación**

**Presente**

Como integrante del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada "Análisis ecotoxicológico de comunidades de anuros que habitan áreas cercanas a un jal minero en Sierra de Huautla" del alumno Biól. Eduardo Aarón Chávez Ramírez, con número de matrícula 10012895, aspirante al grado de Maestro en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, considero que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi VOTO APROBATORIO.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente

**Dr. Norman Mercado Silva**  
PITC B

Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación  
Universidad Autónoma del Estado de Morelos  
Correo E.: norman.mercado@uaem.mx  
Extensión Tel.: 3174



Fecha: 21 Enero 2020

**Comisión de Seguimiento Académico  
Maestría en Biología Integrativa de la  
Biodiversidad y la Conservación**

**Presente**

Como integrante del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada "Análisis ecotoxicológico de comunidades de anuros que habitan áreas cercanas a un jal minero en Sierra de Huautla" del alumno Biól. Eduardo Aarón Chávez Ramírez, con número de matrícula 10012895, aspirante al grado de Maestro en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, considero que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado. Por lo tanto emito mi VOTO APROBATORIO.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente



---

**Dra. Leticia Margarita Ochoa Ochoa**



COORDINACIÓN GENERAL DE PLANEACIÓN Y ADMINISTRACIÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE DESARROLLO SUSTENTABLE

Cuernavaca Mor., 06 de Enero de 2020

**Comisión de Seguimiento Académico  
Maestría en Biología Integrativa de la  
Biodiversidad y la Conservación  
PRESENTE**

Como integrante del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada "**Análisis ecotoxicológico de comunidades de anuros que habitan áreas cercanas a un jal minero en Sierra de Huautla**" del alumno **Biól. Eduardo Aarón Chávez Ramírez**, con número de matrícula **10012895**, aspirante al grado de Maestro en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, considero que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado. Por lo tanto emito mi **VOTO APROBATORIO**.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente  
*Por una humanidad culta  
Una Universidad de Excelencia*

**DRA. MARÍA LUISA CASTREJÓN GODÍNEZ**  
Departamento de Educación Ambiental para la Sustentabilidad en la DGDS  
Profesora en la Facultad de Ciencias Biológicas