



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**TESIS:**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO CAUSADO POR NITRITOS Y FOSFATOS EN  
*Skiffia multipunctata* y *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae)**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA TEMÁTICA: ECOLOGÍA Y CONSERVACION**

**PRESENTA:**

**ALEJANDRA DE LOS SANTOS BAILON**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. REBECA ANELI RUEDA JASSO**

**MORELIA, MICHOACÁN. FEBRERO DE 2013**

**U.M.S.N.H**



**FACULTAD  
DE  
BIOLOGÍA**

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	<b>a</b>
ÍNDICE DE FIGURAS .....	<b>c</b>
ÍNDICE DE TABLAS .....	<b>e</b>
RESUMEN .....	<b>f</b>

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
<b>I.- Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2.- Antecedentes</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.- Toxicidad de los nitritos en peces</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2.- Toxicidad de los fosfatos en peces</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3.- Toxicidad y conducta</b> .....	<b>7</b>
<b>2.4.- La familia Goodeidae</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4.1.- Toxicidad en peces goodeidos</b> .....	<b>11</b>
<b>3.- Pregunta de investigación</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1.- Hipótesis</b> .....	<b>14</b>
<b>4.- Objetivo general</b> .....	<b>14</b>
<b>4.1.- Objetivos específicos</b> .....	<b>14</b>
<b>5.- Materiales y métodos</b> .....	<b>15</b>
<b>5.1.- Obtención de organismos</b> .....	<b>15</b>
<b>5.2.- Preparación de la solución madre</b> .....	<b>15</b>
<b>5.3.- Dosis letal 50 (CL<sub>50</sub>)</b> .....	<b>16</b>
<b>5.4.- Efecto sub letal</b> .....	<b>17</b>
<b>5.5.- Experimento de comportamiento</b> .....	<b>18</b>
<b>5.6.- Análisis de datos</b> .....	<b>19</b>
<b>6.- Resultados</b> .....	<b>20</b>
<b>6.1.- Efecto tóxico sub letal de los nitritos en crías de <i>S. multipunctata</i></b> .....	<b>20</b>
<b>6.1.2.- Histología branquial de crías de <i>S. multipunctata</i> en exposición a nitritos</b> .....	<b>20</b>
<b>6.1.3.- Conducta de <i>S. multipunctata</i> expuestas a nitritos</b> .....	<b>21</b>
<b>6.2.- Conducta de <i>S. multipunctata</i> en exposición a los fosfatos</b> .....	<b>26</b>
<b>6.3.- Efecto tóxico letal (cl<sub>50</sub>) de los nitritos en crías de <i>G. atripinnis</i></b> .....	<b>28</b>
<b>6.4.- Efecto tóxico sub letal de los nitritos en crías de <i>G. atripinnis</i></b> .....	<b>28</b>
<b>6.4.1.- Histología branquial de las crías de <i>G. atripinnis</i></b> .....	<b>28</b>
<b>6.4.2.- Conducta de <i>G. atripinnis</i> en exposición a nitritos</b> .....	<b>29</b>

	Pág.
<b>6.5.- Efecto tóxico letal (CL<sub>50</sub>) de los fosfatos en crías de <i>G. atripinnis</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>6.6.- Efecto tóxico sub letal de los fosfatos en crías de <i>G. atripinnis</i>..</b>	<b>34</b>
<b>6.6.1.-Histología branquial de <i>G. atripinnis</i> en exposición a los fosfatos .....</b>	<b>34</b>
<b>6.6.2.- Conducta de <i>G. atripinnis</i> en exposición a fosfatos .....</b>	<b>35</b>
<b>7.- Discusión .....</b>	<b>41</b>
<b>7.1.- <i>Skiffia multipunctata</i> y <i>Goodea atripinnis</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>7.2.- Tejido branquial y conducta .....</b>	<b>42</b>
<b>7.3.- Especiación química: complejidad del nitrógeno .....</b>	<b>47</b>
<b>7.4.- Normativa nacional e internacional para los compuestos nitrogenados y fósforo .....</b>	<b>49</b>
<b>8.- Conclusiones .....</b>	<b>54</b>
<b>9.- Recomendaciones .....</b>	<b>55</b>
<b>10.- Bibliografía .....</b>	<b>56</b>
<b>10.1.- Referencias electrónicas .....</b>	<b>61</b>
<b>10.2.- Normas de calidad de agua .....</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> -Porcentaje de mortalidad de las crías de <i>S. multipunctata</i> en exposición al nitrito de sodio en el efecto tóxico subletal.....	23
<b>Figura 2.</b> -Aspecto de branquias en crías de <i>S. multipunctata</i> expuestos a nitritos A) 0.00 mg/L, B) 0.016 mg/L por 9 días; C y D) 0.008 mg/L a los 11 y 13 días respectivamente.....	23
<b>Figura 3.</b> -Fotomicrografías de cortes longitudinales de branquias correspondientes al grupo control A y A <sub>1</sub> ) inicio de exposición (40 y 100X respectivamente) y B) fin de exposición (100X).....	24
<b>Figura 4.</b> -Fotomicrografías de las branquias de los peces expuestos a la concentración 0.008 mg/L A) día cuatro (100X), B) 16 (100X) y D) 20 de exposición (100X) respectivamente.....	24
<b>Figura 5.</b> - Fotomicrografías de las branquias de peces expuestos a la concentración 0.016 mg/L A) día 12 (100X), B) 16 y B1) fusión de lamelas secundarias (100X).....	24
<b>Figura 6.</b> -Conducta de las crías de <i>S. multipunctata</i> A) activas durante alimentación, las letras denotan diferencias significativas. Porcentaje de las crías de <i>S. multipunctata</i> en la columna de agua a los días 1, 5, 10 y 15 de exposición a los nitritos B) Control, C) 0.008 mg/L, D)0.016 mg/L.....	25
<b>Figura 7.</b> - Conducta de las crías de <i>S. multipunctata</i> en exposición a los fosfatos A) % de crías activas durante alimentación, las letras denotan diferencias significativas. Porcentaje de las crías de <i>S. multipunctata</i> en la columna de agua a los días 10, 16, 18 y 20 de exposición a los fosfatos B) Control, C) 3.08 mg/L y D) 5.86 mg/L.....	27
<b>Figura 8.</b> - Porcentaje de mortalidad en crías de <i>G. atripinnis</i> durante la exposición letal a los nitritos (0 – 96 horas).....	31
<b>Figura 9.</b> - Porcentaje de mortalidad de las crías de <i>G. atripinnis</i> durante la exposición sub letal al nitrito de sodio.....	31

**Figura 10.-** Fotomicrografías de las branquias de las crías de *G. atripinnis* del grupo control A) al día 10 (100x) y B) día 20 (100x) en las que se aprecian branquias sin alteraciones .....32

**Figura 11.-** Fotomicrografías de branquias de crías de *G. atripinnis* pertenecientes a la concentración de 1.37 mg/L donde se muestra A) aneurisma al día diez de exposición (100X), B) aspecto similar al control (100X) C) branquia con aumento de células cloro y pilar y también D) ligera fusión de lamelas secundarias.....32

**Figura 12.-** Fotomicrografías de las crías de *G. atripinnis* en la exposición a la concentración 1.79 mg/L en donde se muestra A) la presencia de aneurismas (100x), B) aspecto de branquia semejante a la de grupo control y C) fusión de lamelas secundarias, incremento en el número de células cloro y pilar e inflamación de epitelio (100X).....32

**Figura 13.-** Conducta de las crías de *G. atripinnis* en exposición a los nitritos A) % de crías activas durante alimentación, las letras denotan diferencias significativas. Porcentaje de las crías de *G. atripinnis* en la columna de agua a los días 1, 5, 10 y 15 de exposición a los nitritos B) Control, C) 1.49 mg/L y D) 1.86 mg/L.....33

**Figura 14.-** Porcentaje de mortalidad en crías de *G. atripinnis* durante la exposición a los fosfatos.....36

**Figura 15.-** Porcentaje de mortalidad de las crías de *G. atripinnis* durante la exposición al fosfato de sodio.....36

**Figura 16.-** Fotomicrografías de cortes longitudinales de branquias de las crías de *G. atripinnis* pertenecientes al grupo control.....37

**Figura 17.-** Fotomicrografías de cortes longitudinales de branquias de crías de *G. atripinnis* expuestas a los fosfatos (1160 y 1435 mg/L) A) con sus componentes branquiales sin alteraciones y similares a los pertenecientes al grupo control, B) y ligera proliferación de células, hinchazón de epitelio y fusión lamelar parcial .....37

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.-</b> Evaluación de los niveles de nitritos y fósforo en ecosistemas acuáticos del Estado de Michoacán.....	3
<b>Tabla 2.-</b> Estatus de conservación de los goodeidos propuestos por distintos autores.....	9
<b>Tabla 3.-</b> Estatus de conservación de <i>S. multipunctata</i> y <i>G. atripinnis</i> .....	11
<b>Tabla 4 A.-</b> Resumen de los efectos causados por nitritos en crías de <i>S. multipunctata</i> y <i>G. atripinnis</i> .....	39
<b>Tabla 4 B.-</b> Resumen de los efectos causados por fosfatos en crías de <i>S. multipunctata</i> y <i>G. atripinnis</i> .....	40
<b>Tabla 5.-</b> Comparación de normas y sus respectivos parámetros considerados para la protección de la vida acuática.....	52
<b>Tabla 6.-</b> Valores considerados con respecto al fósforo por país.....	53
<b>Tabla 7.-</b> Niveles tróficos y sus respectivos valores considerados para Canadá y La Unión Europea.....	53

## RESUMEN

Los cuerpos de agua de la Mesa Central de México tienen elevados niveles de contaminación. Algunos de los principales contaminantes son los nitritos y fosfatos que resultan del uso del agua con fines domésticos, agrícolas, ganaderos e industriales. En estos cuerpos de agua habitan especies endémicas como los peces de la subfamilia Goodeinae, los cuales representan un aporte importante a la biodiversidad de México y del planeta. Debido a que la concentración de nitritos y fosfatos es alta en los cuerpos de agua de la mesa central, se evaluó el efecto negativo de ambos iones en las crías de los peces goodeídos *S. multipunctata* y *G. atripinnis*. Lo anterior con el objetivo de establecer un intervalo preliminar de tolerancia para el grupo de peces goodeídos. Para ambas especies e iones se determinó  $CL_{50}$ , los efectos sub letales y sus efectos en las modificaciones de peso, alteraciones a nivel de tejido branquial y conducta. Los resultados confirmaron que *S. multipunctata* es una especie sensible ( $CL_{50}$ -24 h 0.064 mg/L  $NO_2^-$ ,  $CL_{50}$ -96 h 13.2 mg/L  $PO_4^{3-}$ ) en comparación con *G. atripinnis* ( $CL_{50}$ -96 h 2.03 mg/L  $NO_2^-$ ,  $CL_{50}$ -96 h 3529.9 mg/L  $PO_4^{3-}$ ). Las alteraciones del tejido branquial (hiperplasia, atrofia y fusión lamelar) y las alteraciones conductuales generaron efectos más conspicuos en las crías de *S. multipunctata*. En cuanto al efecto de los iones evaluados, los nitritos afectaron en forma más severa los parámetros evaluados que los fosfatos. A pesar de que *S. multipunctata* es una especie sensible y *G. atripinnis* una especie tolerante, con la información generada en el presente estudio, no nos permite determinar un intervalo preliminar de tolerancia para el grupo de los goodeídos. La información generada es de gran utilidad ya que hasta el momento no se contaba con datos de la diferente respuesta de las especies de goodeidos a contaminantes comunes. Sin embargo, el grupo es muy diverso y existen especies aún más sensibles que *S. multipunctata*. Por otro lado, es indispensable realizar estudios similares en campo, donde se evalúen las condiciones reales a la que los peces están expuestos. Conjuntamente, es indispensable evaluar los parámetros considerados en la NOM-001-ECOL-1996 para derivados de nitrógeno y fósforo. Igualmente, es preciso considerar el saneamiento y recuperación de los ecosistemas acuáticos particularmente donde habitan los peces goodeídos.



## I.- INTRODUCCIÓN

Los peces de México constituyen una de las faunas más variadas del mundo, ya que en nuestro país se pueden encontrar prácticamente todos los tipos de ecosistemas acuáticos del planeta. De las 27,999 especies de peces descritas (Nelson 2006), México cuenta con el 7.6% de ellas (2122 especies) (Espinosa-Pérez 1993). Solo para la Mesa Central de México se han registrado aproximadamente 100 especies nativas de peces, de las cuales 70% son endémicas de la región; entre ellas se encuentra la familia Goodeidae considerada como una de las más representativas de la zona (Domínguez 2008). Sin embargo, esta parte del país es también de las más pobladas y contaminadas. Los asentamientos urbanos e industriales que aprovechan el recurso hídrico para su desarrollo, descargan en su gran mayoría sus aguas residuales (sin tratamiento) y provocan un grave impacto ambiental (López *et al.* 2007). En consecuencia las especies que allí habitan están en un grave riesgo, que es producto del confinamiento de los peces en fragmentos aislados debido a la destrucción del hábitat. Los principales factores causantes del daño en los ecosistemas dulceacuícolas incluyen: a) la sobreexplotación y desecación de los cuerpos de agua para abastecer la creciente demanda de las zonas urbanas; b) la destrucción del hábitat por obras hidráulicas, almacenamiento y transporte del agua a las zonas urbanas; c) la degradación de los sistemas acuáticos y terrestres por diversas actividades antropogénicas, incluyendo el vertido de las aguas residuales crudas a los cuerpos de agua; d) la introducción de especies exóticas con fines piscícolas (De La Vega 2003) y accidentales y e) al incumplimiento de las normativas vigentes para la protección de los cuerpos de agua (Rueda *et al.* 2007). Todo esto contribuye a que el hábitat de estas especies tenga niveles de contaminación muy elevados y que en consecuencia un gran número de especies, entre ellas de goodeidos, se encuentren en un estado crítico de conservación (Domínguez 2008, Jelks *et al.* 2008).

Ante el desmedido aporte de contaminantes a los cuerpos de agua por diversas fuentes, es importante conocer el daño que éstos ocasionan a las especies de peces, especialmente endémicas y nativas que se encuentran amenazadas. Debido a la importancia científica y biológica que representan los goodeídos y por su estado crítico

de conservación, es importante establecer los niveles de tolerancia a contaminantes comunes de cuerpos de agua, como lo son el nitrito y el fósforo, en especies sensibles y tolerantes. Con esta información se podrán establecer las condiciones mínimas necesarias de calidad del agua para garantizar su permanencia en el hábitat como parte de la fauna silvestre o para su repoblación a su hábitat original. Adicionalmente, se conocerán las condiciones más adecuadas para su mantenimiento en condiciones controladas.

## 2.- ANTECEDENTES

El nitrógeno y el fósforo constituyen los dos elementos más importantes para la productividad primaria en los sistemas acuáticos. Sin embargo, como resultado de la contaminación orgánica, industrial y agrícola estos elementos son aportados a los cuerpos de agua en cantidades desmedidas. Ambos elementos se pueden encontrar en diversas formas en los cuerpos de agua y en buena medida, de la concentración de ellos dependen las condiciones de calidad ambiental (FWR 2010).

En cuerpos de agua del Estado de Michoacán en los que habitan o solían habitar peces goodeídos, los registros de la presencia tanto de nitrógeno como de fósforo han sido muy variables (Tabla 1).

Tabla 1.-Evaluación de los niveles de nitritos y fósforo en ecosistemas acuáticos del Estado de Michoacán.

AUTOR	AÑO	LUGAR	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> mg/L		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/L	
			Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
Solórzano S. E	1994	La Piedad	0.42		0.72	
Solórzano S. E	1994	Río Angulo	0.32		0.51	
De la Lanza E. G	1995	Zirahuen	0.14		0.30	
Gómez M. J	2003	La Mintzita	0.16		0.21	
Escutia L. Y	2005	Zacapu	0.34		0.63	
Herrera R. M	2007	Cuitzeo	ND		1.56	
Cuevas <i>et al.</i>	2011	Lerma (La Piedad, Mich)	41		10.56	
			PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> total mg/L		PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> reactivo mg/L	
			Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
Huacuz	1990-1991	Cuitzeo	0.78	2.74	0.32	1.90
Ledesma	1998-1999	La Mintzita	3.27	21.92	1.01	2.83
Herrera R. M	2007	Cuitzeo	0.39	14.98	NE	NE
Pérez	2007-2008	P. Umécuaro	0.00	0.28	0.006	0.32
Hernández	2008	P. La Sabaneta	0.04	0.16	0.01	0.02
Cuevas <i>et al.</i>	2011	Lerma (La Piedad, Mich)	0.10	30.91	NE	NE
Hernández	2011	Los Espinos	NE	1.21	NE	0.45
		Tacámbaro	NE	0.85	NE	0.23
		Teremendo	NE	0.99	NE	0.19

NE:no especificado.

La Norma Oficial Mexicana 001-ECOL-1996, establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes

nacionales. Para la protección de la vida acuática se marcan como límites permisibles para nitrógeno total: 15 y 25 mg/L y para el fósforo total 5 y 10 mg/L en promedio mensual y diario respectivamente. En ambos casos se considera el aporte de contaminantes como entradas puntuales, en las que al entrar las aguas residuales (con los valores máximos antes mencionados) a los cuerpos de agua, ocurrirán diluciones de los contaminantes y que la concentración de éstos será menor. Sin embargo, no se consideran los aportes que entran por lixiviación en diferentes y numerosos puntos de los cauces (entradas no puntuales). No obstante, en las zonas agrícolas el uso de fertilizantes y plaguicidas es excesivo y si a esto se suman los problemas de deforestación que presentan la mayoría de las tierras y que ocasionan una excesiva lixiviación, se tendrá como consecuencia que las cantidades de nitritos y fosfatos que ingresan por esta vía son altas (Carpenter *et al.* 1998, Lassaletta 2004, Ramírez *et al.* 2009).

## **2.1.- Toxicidad de los nitritos en peces**

El nitrito se encuentra de manera natural en cuerpos de agua, su concentración generalmente es menor a 0.005 mg/L, no obstante, bajo algunas circunstancias su concentración aumenta drásticamente (Lewis y Morris 1986). En altas concentraciones esta forma es extremadamente tóxica para los organismos ya que su presencia causa la formación de metahemoglobina en la sangre de los peces. Este fenómeno es resultado de una alteración de la hemoglobina, que provoca la pérdida de la capacidad de transportar el oxígeno en la sangre. Al disminuir la oxigenación del pez, se producen alteraciones fisiológicas importantes como: acumulación de nitritos en branquias, hígado, cerebro y músculo, reducción en la tasa de crecimiento, alteración del comportamiento y en situaciones extremas, la muerte de los organismos (Lewis y Morris 1986, Kroupova *et al.* 2005).

La toxicidad de los nitritos ha sido documentada en peces con importancia en la acuicultura, ya que éste tiende a acumularse en altas concentraciones en los cultivos debido a las altas densidades de organismos confinados. Esto ocasiona distintas afecciones a los peces y consecuentemente pérdidas económicas (Welker *et al.* 2011).

Una consecuencia directa de la exposición prolongada a los nitritos, es la alteración del crecimiento en los peces. En el pez zebra danio (*Danio rerio*, Hamilton 1822) la exposición prolongada a los nitritos causó disminución del crecimiento conforme aumentó la concentración del tóxico; el efecto fue más evidente al comparar con peces libres del tóxico (Voslárová *et al.* 2008).

En la exposición a concentraciones crecientes de nitrito de sodio (0, 0.44, 0.88, 1.75, 3.5, 7, 14 y 28 mg/L) para el pez luciperca (*Sander luciperca*) se determinó una LC<sub>50</sub> 120 h-6.1 mg/L. Posteriormente, en la exposición crónica, los peces expuestos evidenciaron acumulación del nitrito en plasma y músculo y también formación de metahemoglobina, aunque esto ocurrió sólo en la concentración de 3.5 mg/L (Wuertz *et al.* 2013).

Algunos parámetros químicos presentes en los cuerpos de agua pueden influir positiva o negativamente en la toxicidad de los nitritos. En la carpa plateada (*Barbonymus gonionotus*, Bleeker, 1849) en exposición al nitrito se obtuvo una CL<sub>50</sub>-96 h 7.91 mg/L a valores de pH 7.4–7.6. Sin embargo, concentraciones menores a 4 mg/L de nitritos causaron 100% de mortalidad con pH 5 (Yusoff *et al.* 1998).

Los peces marinos son más tolerantes a la toxicidad del nitrito comparados con los peces dulceacuícolas, esta tolerancia se debe a la presencia de cloruro en el medio. Las branquias captan nitrito pero en presencia de cloruro se da una competencia entre estos iones, lo cual ayuda a mitigar el efecto tóxico de los nitritos (Lewis y Morris 1986, Jensen 2003).

El pez marino conocido comúnmente como pez roca (*Sebastes inermis*, Cuvier, 1829) es una especie comercialmente importante en Japón y por su tolerancia a las condiciones ambientales adversas, es considerada una excelente opción para piscicultura. Este organismo presentó una CL<sub>50</sub>-96 h a nitritos de 700 mg/L; durante la exposición al tóxico los peces presentaron disminución en el conteo de eritrocitos y consecuentemente el contenido de hemoglobina en sangre disminuyó; lo anterior estuvo directamente relacionado con la concentración y el periodo de exposición al tóxico. Además los peces mostraron otras alteraciones en branquias tales como: fusión

lamelar e hiperplasia, necrosis de dermis y alteraciones en hígado y riñón (In-Seok *et al.* 2007).

En la carpa común (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758) la exposición a concentraciones de nitritos que ocurren en el ambiente (1.45 mmol/L) causaron alta mortalidad en los organismos expuestos (51%). Esta alta mortalidad se explicó por el incremento significativo de los niveles de metahemoglobina y la disminución de eritrocitos; asimismo se observó acumulación del tóxico en hígado y músculo (Kroupova *et al.* 2006).

## **2.2.- Toxicidad de los fosfatos en peces**

A pesar de que el fósforo en sus diversas formas se encuentra en elevadas concentraciones en los cuerpos de agua, son escasos los trabajos que documenten su efecto en peces. No obstante, se han realizado estudios para conocer la toxicidad de detergentes y plaguicidas, que entre sus componentes incluyen a los fosfatos.

En la carpa común (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758), la exposición subletal al detergente LAS (sulfonato de alquibenceno lineal) causó en el pez una disminución en el conteo de eritrocitos y consecuentemente una disminución del contenido de hemoglobina en sangre, estas alteraciones estuvieron relacionadas con el tiempo de exposición al detergente (Bielinska 1987). En tanto que en el bagre (*Ictalurus* sp.), el mismo compuesto provocó modificaciones del comportamiento y en la morfología de las barbas, además de que causaron la formación de hematomas y el desprendimiento de capas superficiales de la piel (Zeni y Stagni 1992, Zeni *et al.* 2001).

De igual forma, la mezcla del herbicida Roundup (glifosato-N-fosfometilglicina) y Cosmoflux han mostrado tener efectos adversos en el pez Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*, Cuvier 1818). Estas se manifiestan en hiperplasia de células pavimentosas en epidermis, de lamelas primarias y secundarias, fusión de las mismas y necrosis multifocal de túbulos renales de hígado, así como lesiones en estómago y cerebro. Estas afectaciones fueron más severas conforme aumentó la mezcla de herbicidas (Ramírez *et al.* 2009).

### 2.3.- Toxicidad y conducta

El comportamiento reúne la manifestación acumulada de procesos bioquímicos, fisiológicos y genéticos, que son esenciales para la vida, los cuales se expresan mediante una secuencia de acciones que operan a través del sistema nervioso (central y periférico). Éste permite que un organismo se adapte y responda a los estímulos que recibe del medio con la finalidad de sobrevivir en un ambiente cambiante (Kane *et al.* 2005). De esta forma, el comportamiento relaciona numerosos niveles de organización biológica, ya que conciernen a él procesos fisiológicos y ecológicos de un organismo. Dado que el comportamiento no es un proceso aleatorio, sino una secuencia de actividades estructuradas y predecibles que son diseñadas para garantizar la aptitud y supervivencia (éxito) de los individuos, las alteraciones conductuales son una herramienta valiosa para discernir y evaluar los efectos de las exposiciones a contaminantes ambientales (Scott y Sloman 2004, Kane *et al.* 2005, Hellou 2011).

En ambientes acuáticos, las concentraciones de los contaminantes ocurren a bajas concentraciones y dado que éstas permanecen largo tiempo, los organismos que allí habitan, sufren periodos de exposición prolongados en contacto directo con los contaminantes. Bajo estas circunstancias, los organismos pueden expresar alteraciones distintas a la mortalidad. La exposición prolongada puede tener impactos negativos en el desarrollo, crecimiento y reproducción de los organismos y que a largo plazo puede afectar severamente a la especie y en consecuencia a toda la estructura de un ecosistema.

La vida de los peces, como de todas las especies, está asociada con numerosas relaciones inter e intraespecíficas que dependen del desempeño de un comportamiento apropiado. Los criterios de valoración del comportamiento pueden consistir de una gran variedad de actividades (escape, equilibrio, excavación, respuesta al miedo, alimentación, locomoción, cortejo, memoria, protección de crías, respiración, toma de riesgos) (Hellou 2011). Consecuentemente, la alteración del comportamiento “normal” de alguno de los criterios anteriores puede ser indicativo de la presencia de algún factor

nocivo para las especies que allí habitan y con ello se pueden tomar medidas apropiadas para garantizar la salud y conservación de tal ecosistema.

Las alteraciones de conducta ocasionadas por contaminantes presentes en los ecosistemas acuáticos y el efecto de los mismos en poblaciones de peces se han comenzado a investigar recientemente. Hasta el momento, los estudios realizados son escasos. En los trabajos en esta área se ha señalado que las exposiciones crónicas a contaminantes pueden ocasionar el decline de poblaciones y la extinción de especies (Kane *et al.* 2005).

Un ejemplo de ello se observó en el pez goodeído *Girardinichthys multiradiatus* (Meek, 1904), el cual cambió su comportamiento reproductivo por efecto del plaguicida metilparation. *G. multiradiatus* es una especie con un marcado dimorfismo sexual, por lo que la calidad de los rasgos morfológicos y de cortejo son indispensables para el éxito de la especie. Los machos de esta especie presentan aletas grandes muy coloreadas y un vistoso cortejo; estas características permiten a las hembras seleccionar a los machos. Sin embargo, en los peces expuestos a concentraciones sub letales del plaguicida (0.008, 0.02 y 0.04  $\mu\text{g/g}$  peso seco;  $\text{CL}_{50}$  0.165  $\mu\text{g/g}$ ) se mostraron aletas menos desarrolladas y coloraciones menos conspicuas. En consecuencia, el comportamiento reproductivo fue menos enérgico (frecuencia y duración de cortejo) comparativamente con el grupo control. Este efecto se transmitió a la segunda generación, ya que las alteraciones repercutieron en las generaciones posteriores (Arellano y Macías 2009).

Otro ejemplo de modificaciones de la conducta por la exposición prolongada a contaminantes presentes en el ambiente se observó en la exposición del pez beta (*Betta splendens*, Regan 1910) a fitoestrógenos presentes en aguas urbanas (por 72 horas). Los peces expuestos mostraron una disminución en la intensidad en agresividad comparativamente con los peces del tratamiento libre del tóxico (Clotfelter y Rodríguez 2005).



## 2.4.- La Familia Goodeidae

Una de las zonas privilegiadas por la gran diversidad de especies que alberga es la Mesa Central de México. En la zona se distribuye un grupo característico: la familia Goodeidae, la cual se divide en dos subfamilias: Empetrichthyinae, que está restringida a la región este de Estados Unidos y la subfamilia Goodeinae exclusivamente mexicana, compuesta por 19 géneros y 41 especies (Domínguez y Pérez 2007). No obstante, la riqueza de especies endémicas en esta zona, la distribución de los goodeidos está siendo afectada por diversas actividades humanas, lo cual se manifiesta como una fuerte presión sobre los recursos naturales (De la Vega-Salazar 2005). Diversos autores coinciden en que los goodeídos mexicanos se encuentran en riesgo latente, ya que muchas de sus especies se encuentran en algún estatus de conservación (Tabla 2).

Tabla 2.- Estatus de conservación de los goodeidos propuestos por distintos autores.

Autor	Extinto	Peligro crítico	Peligro	Vulnerable	R. próximo	Sin riesgo
De la Vega-Salazar 2005	2	8	11	7	4	2
NOM-059-SEMARNAT 2010	1	18	Amenazados 4*	P. especial 1*		
Jelks <i>et al.</i> 2008	4 Xp1	30	4	8		

\*Estatus de conservación distinto al señalado en el encabezado de tabla para NOM-059.

La severa explotación de los recursos naturales en la mesa central de México por la destacada actividad agrícola, ganadera e industrial ha provocado que la mayoría de sus cuerpos de agua figuren entre los más contaminados. Esto ha provocado que muchas especies de goodeídos hayan restringido sus áreas de distribución o incluso desaparecido, en tanto que algunas especies persisten en cuerpos de agua con altos niveles de contaminación (De la Vega-Salazar 2005). Esto es un reflejo de los distintos

niveles de tolerancia de las especies, ya que aún dentro del mismo grupo son las especies con mayor sensibilidad las que se encuentran en mayor riesgo.

Entre los miembros de la sub familia Goodeinae se encuentra *Skiffia multipunctata* (Pellegrin 1901), comúnmente conocido como “tiro manchado”, el cual es un pez de cuerpo alto y comprimido, con una longitud total promedio de cinco a siete cm. Las hembras presentan una coloración verde olivo en tonos brillantes, con un punto negro sobre el margen de cada escama. En los machos la coloración es uniforme en tonos verde olivo, con las aletas dorsal y anal negras con el margen amarillo, asimismo presentan manchas negras en cantidad, forma y tamaño variable, las cuales son de gran importancia en la selección sexual por parte de las hembras (Arellano-Aguilar y Macías 2008). *S. multipunctata* habita en aguas con poca corriente, en fondos de lodo, arena y rocas, se distribuye en cuerpos de agua de la cuenca del Lerma-Santiago. Esta especie es considerada una especie sensible a la alteración del medio; no soporta cambios ligeros en el ambiente (Huidobro 2000).

Otro de los representantes de los goodeidos es *Goodea atripinnis* (Jordan 1880) conocida comúnmente como “chehua”. A diferencia de la mayoría de los goodeidos posee un cuerpo robusto, comprimido en su parte posterior, con una longitud total que va de 13 a 15 cm. Esta especie habita en aguas poco profundas, templadas o semicálidas, sobre fondos lodosos, cenagosos, pedregosos y ricos en vegetación acuática sumergida, flotante y emergente. *G. atripinnis* es considerada una especie muy tolerante a la degradación ambiental, soporta altos niveles de sulfatos, nitratos, fosfatos, aguas alcalinas y duras, lo que permite su amplia distribución, siendo posible encontrarla en cuerpos de agua con altos niveles de contaminación como es el caso del río Lerma (Huidobro 2000, De la Vega Salazar 2005, Rueda-Jasso *et al.* 2011). El contraste en la tolerancia de ambas especies es un factor determinante para su distribución y el estatus de conservación actual (Tabla 3).

Tabla 3.- Estatus de conservación de *S. multipunctata* y *G. atripinnis*

Autor	Año	Especie	Estatus de conservación
De la Vega-Salazar	2005	<i>S. multipunctata</i>	Vulnerable
Jelks <i>et al</i>	2008	<i>S. multipunctata</i>	En peligro de extinción
NOM-059 SEMARNAT	2010	<i>S. multipunctata</i>	Amenazada
De la Vega-Salazar	2005	<i>G. atripinnis</i>	Sin riesgo
Jelks <i>et al</i>	2008	<i>G. atripinnis</i>	No figura en la lista
NOM-059 SEMARNAT	2010	<i>G. atripinnis</i>	No figura en la lista

#### 2.4.1- Toxicidad en peces goodeidos

A pesar de la importancia biológica (grupo modelo para estudiar la viviparidad), adaptativa y evolutiva de los goodeidos (Domínguez-Domínguez *et al.* 2005) es un grupo de peces poco estudiado, particularmente desde el punto de vista toxicológico. Entre los pocos trabajos realizados bajo este enfoque, se comparó el efecto de las aguas prístinas (manantial El Rincón) vs aguas contaminadas por la industria azucarera (represa La Vega) en dos especies de peces goodeídos que habitan en ambos sitios: *Ameca splendens* y *Goodea atripinnis*. Para ambas especies, las poblaciones de la represa La Vega registraron niveles elevados de los biomarcadores de estrés oxidativo (gamma glutamil transpeptidasa, acetilcolinesterasa, etoxiresorufina-O-deetilase y peroxidación lipídica), aunque la especie más sensible fue *A. splendens* (Tejera-Vera *et al.* 2007).

En otro estudio de toxicidad en peces goodeidos se investigó el efecto del plaguicida metil paratión (ampliamente usado en la zona de distribución de los goodeidos). La exposición a este tóxico provocó alta mortalidad (68%) a los peces *Girardinichthys multiradiatus*. Entre los peces sobrevivientes se observó que fueron significativamente más pequeños y los machos vieron comprometido el óptimo desarrollo de aletas y el patrón de coloración, en comparación con los peces libres del tóxico. Estos últimos mostraron más actividad y mayor éxito en el cortejo en comparación con los machos expuestos al tóxico. Las alteraciones provocadas por la

exposición al plaguicida afectaron la apariencia de los machos, lo que puede comprometer la selección sexual y consecuentemente el bienestar de la población (Arellano-Aguilar y Macías 2008).

En *G. atripinnis* se investigó el efecto del plaguicida Yerbimat también muy usado en zonas donde habitan peces goodeídos. Se determinó una  $CL_{50}$ -96 h 38.95 mg/L. En las exposiciones sub letales se registraron niveles elevados de peroxidación lipídica en branquias e hígado, bajos niveles de la enzima catalasa en branquias y elevados en hígado, asimismo se evidenciaron alteraciones histológicas en branquias e hígado, las cuales algunas fueron irreversibles (Ortiz-Ordoñez *et al.* 2011).

En el caso de las crías del pez goodeído *S. multipunctata*, éstas mostraron una respuesta al tóxico a partir de la concentración 0.028 mg/L de nitritos a las 6 horas de exposición y una  $CL_{50}$  0.064 mg/L a -24 horas de exposición. Las observaciones *post mortem* revelaron que las crías presentaban la boca abierta y la forma del cuerpo curvada hacia arriba, así como la presencia de hematomas en la aleta dorsal, en la región opercular y ventral del cuerpo (Villalva 2009).

En tanto que en la exposición a los fosfatos, las crías presentaron alteraciones en la conducta a las 12 horas de exposición a partir de la concentración 5.86 mg/L; la  $CL_{50}$  obtenida fue 13.18 mg/L-96 horas. Bajo el efecto de los fosfatos, las crías tratadas con nitritos exhibieron hematomas en la región del pedúnculo caudal, aleta dorsal y anal, región opercular y gastrointestinal (De Los Santos 2010).

Al plantear el desarrollo de este trabajo se contaba con la determinación de  $CL_{50}$  para nitritos y fosfatos para *S. multipunctata* y con el efecto sub letal de los fosfatos, incluyendo la histología de las branquias. Para *G. atripinnis* no se tenían antecedentes de respuesta a estos tóxicos.

*S. multipunctata* y *G. atripinnis* son especies con grado de sensibilidad extremos, la primera sensible y la segunda muy tolerante. En la mayoría de los cuerpos de agua hábitat de estas especies se tienen altas concentraciones de diversos contaminantes (entre ellos nitritos y fosfatos). Por lo anterior, el presente trabajo propuso determinar

CL<sub>50</sub> y el efecto sub letal para nitritos y fosfatos en crías de *G. atripinnis* y evaluar el efecto sub letal de los nitritos en crías de *S. multipunctata*. Con esta información se planteó complementar la información hasta entonces existente para *S. multipunctata*, considerada como especie sensible y obtener los resultados de una especie tolerante *G. atripinnis*. Esta información (límites de tolerancia a los fosfatos y nitritos para una especie sensible y una tolerante) permitirá establecer un intervalo preliminar de tolerancia a dichos contaminantes para el grupo de peces goodeidos.

### 3.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las crías de *S. multipunctata* y *G. atripinnis* presentaran respuesta diferentes a nivel de supervivencia, afectaciones morfológicas y conductuales por efecto de los nitritos y los fosfatos?

¿Considerando a *S. multipunctata* como especie sensible y *G. atripinnis* como tolerante, es posible determinar un intervalo preliminar de tolerancia para el grupo?

#### 3.1.- HIPÓTESIS

Debido que los peces goodeidos *S. multipunctata* y de *G. atripinnis* presentan distinto grado de sensibilidad a los nitritos y los fosfatos, esto se reflejará en términos de mortalidad, daño tisular (branquias) y conducta en pruebas de laboratorio.

### 4.- OBJETIVO GENERAL

Establecer el intervalo preliminar de tolerancia para las crías de los goodeidos *S. multipunctata* y de *G. atripinnis* a los nitritos y fosfatos, a través de pruebas toxicológicas y conductuales para ambos tóxicos.

#### 4.1.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Obtener la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) para los fosfatos y nitritos en crías de *G. atripinnis*.
- ❖ Determinar el efecto sub letal de los nitritos y fosfatos en crías de *G. atripinnis*, y de los nitritos para *S. multipunctata*, evaluando las variaciones en peso y talla, las modificaciones de conducta y las alteraciones de los tejidos (branquias).
- ❖ Comparar los datos obtenidos con los valores establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996.

## 5.- Materiales y métodos

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Acuicultura, de la Facultad de Biología de la UMSNH, siguiendo los lineamientos establecidos por la OCDE (2008) para pruebas de toxicidad.

### 5.1.- Obtención de organismos

Las crías se obtuvieron a partir de los reproductores que forman parte del programa “Conservación, Preservación y Manejo de Goodeidos Mexicanos”. El proceso inició con la selección de machos y hembras en óptimas condiciones de *G. atripinnis* y *S. multipunctata*, los cuales se colocaron en acuarios de 90 L para iniciar la reproducción. Los organismos se alimentaron a saciedad con alimento vivo (pulga de agua, *Daphnia pulex*, Linnaeus 1758) y con alimento inerte (hojuela Wardley, USA). Una vez que se presentaron hembras grávidas, éstas se trasladaron a acuarios especiales de maternidad, para tener un mejor seguimiento de los organismos. Cuando las crías nacieron se colocaron en acuarios de siete litros y se anotó la fecha de nacimiento. Lo anterior se realizó por separado para cada especie. Cuando se alcanzó el número necesario de organismos para realizar los experimentos (para  $CL_{50}$  150 crías de cada especie y para efecto subletal 90 crías por especie), las crías se pesaron (balanza analítica Ohaus Adventurer, China, precisión 0.0001 g) y midieron (vernier digital Fisher Scientific S/N 1366162) individualmente. Para la selección de los organismos experimentales se descartaron pesos y longitudes extremas. Posteriormente las crías se colocaron en acuarios con 6 L de volumen, procurando mantener biomásas similares para cada acuario.

### 5.2.- Preparación de la solución madre

La solución madre para los nitritos y fosfatos se prepararon a partir de nitrito de sodio ( $NaNO_2$ , grado analítico, pureza 97%, Sigma-Aldrich) y fosfato de sodio dibásico, 7- hidrato cristal ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , grado analítico, pureza 98.56%, Baker)

respectivamente, utilizando en ambos casos agua desionizada como disolvente. Las soluciones se agitaron hasta que los solutos quedaron completamente disueltos y posteriormente se llevaron a aforo. Una vez preparada las soluciones madre, se hicieron las diluciones correspondientes para alcanzar las concentraciones calculadas a probar y posteriormente estas fueron agregadas a los acuarios.

### 5.3- Dosis letal 50 (CL<sub>50</sub>)

Los experimentos se realizaron en un área aislada con iluminación y temperatura controlada, en un sistema estático. Los experimentos se llevaron a cabo en agua destilada para evitar la interferencia de los fosfatos y nitritos con otros iones. Las concentraciones a probar en *G. atripinnis* en exposición a los nitritos y fosfatos fueron: 0.28, 0.54, 1.03, 1.9, 3.5, 6.5, 12.03 y 1141.8, 1712.7, 2569.0 y 3853.6 respectivamente. En todas las pruebas CL<sub>50</sub> se probó un tratamiento control sin tóxico (0.00 mg/L).

Los acuarios con las respectivas concentraciones a probar de ambos tóxicos y el grupo control se mantuvieron en baño María para mantener constante la temperatura  $22 \pm 0.5$  °C, el resto de las condiciones se estableció en los intervalos: pH  $7.5 \pm 0.5$ , oxígeno disuelto  $8 \pm 0.5$  mg/L y aireación moderada. El experimento se mantuvo en iluminación continua con lámparas de luz de día de 60 Watts. El experimento tuvo una duración de 96 horas durante las cuales no se alimentó a los organismos a fin de no interferir con las condiciones preestablecidas. Para cada concentración y el control se tuvieron tres réplicas con diez organismos cada una, por lo que para cada concentración se usaron en total 30 crías (n=30), lo anterior de acuerdo a los criterios establecidos para la realización de pruebas de toxicidad (OECD, 2008).

Una vez agregado el tóxico, se registró la mortalidad, conducta, movimiento opercular, forma y velocidad de nado de los organismos, a las 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 h. Cuando se presentaron organismos muertos, éstos se retiraron



inmediatamente del acuario y posteriormente se observaron detalladamente en el microscopio estereoscópico y se tomaron fotografías de ellos.

#### **5.4.- Efecto sub letal**

En el efecto sub letal para *S. multipunctata* las concentraciones de nitritos a probar fueron: 0.008, 0.016 y el grupo control libre de tóxico. Las concentraciones sub letales de nitritos para *Goodea atripinnis* fueron 1.37, 1.79 y 0.00 mg/L y para los fosfatos se probaron las concentraciones de 1160, 1435 y 0.00 mg7L.

El efecto tóxico sub letal es una prueba de mayor duración en donde el método de prueba es dinámico y por ser de larga duración se utilizan concentraciones por debajo de la CL<sub>50</sub>. El objetivo de la prueba es observar el efecto sub letal en los organismos. Las condiciones en este experimento fueron iguales a las descritas para CL<sub>50</sub>, con la variante de que los organismos se alimentaron con hojuela (Wardley, USA) dos veces al día, en una proporción del 12% de la biomasa de peces por acuario. Para este experimento el sistema fue continuo y tuvo una duración de 20 días.

Para cada concentración se usaron tres repeticiones cada una con diez crías respectivamente (n=30 por concentración). De igual forma que en el experimento de CL<sub>50</sub>, se seleccionaron, midieron y pesaron las crías, posteriormente se colocaron en los acuarios buscando mantener biomasa similares. Cada 72 horas en la exposición a los nitritos (y fosfatos) se seleccionaron tres peces de cada concentración que fueron pesados y medidos, posteriormente se fijaron en solución Bouin y se colocaron en viales de cristal con su respectiva etiqueta.

Los organismos fijados se incluyeron en parafina, posteriormente se realizaron cortes coronales de dos micras, mismos que fueron teñidos en hematoxilina-eosina. Los cortes se observaron en microscopio compuesto (Olympus, SZ61, Japón) buscando diferencias a nivel branquial entre los peces del grupo control y los expuestos a los tóxicos. Los cortes elegidos fueron fotografiados con cámara digital (Lumera Infinity 1-

5C, Canadá) y el programa Infinity Analyze versión 5.0.3. Finalmente se realizó una descripción de los cortes seleccionados.

### **5.5.- Experimento de comportamiento**

En éste experimento se utilizaron las concentraciones sub letales, para *S. multipunctata*: 0.00, 0.008 y 0.016 mg/ y 3.08, 5.86 y 0.00 mg/L para nitritos y fosfatos respectivamente. Las concentraciones a utilizar para *G. atripinnis* en exposición a los nitritos y fosfatos fueron 0.00, 1.49 y 1.86 mg/L y 0.00, 1160 y 1435 mg/L respectivamente.

El experimento se realizó en un área completamente aislada para evitar la interferencia con los organismos. Se utilizaron 15 peces por tratamiento que fueron colocados en acuarios de 70 cm altura, 30 cm largo y 20 cm ancho, los cuales se llenaron con 30 litros de agua con la concentración correspondiente del tóxico a probar o sin tóxico para el grupo control. Los acuarios se dividieron en superficie, parte media y fondo con respecto a la columna de agua. Los peces se agruparon en biomasas similares para cada tratamiento. Una vez que se colocaron en los acuarios, los peces se alimentaron dos veces al día (9 AM y 2 PM) al 12% de biomasa de peces por acuario. Las condiciones fueron iguales que en el efecto sub letal con la variante de que los organismos se mantuvieron en un fotoperiodo de 12 L/12 H. Para la obtención de datos de conducta se realizaron grabaciones con un sistema de circuito cerrado de televisión. Las grabaciones se iniciaron cinco minutos previos a la adición de alimento, lo anterior con el objetivo de determinar la presencia de los peces en la columna de agua y 15 minutos después de que el alimento fue incorporado, con ello se determinó la respuesta de los peces al mismo. Este experimento tuvo una duración de 15-25 días dependiendo de la especie.

## 5.6.- Análisis de datos

Para determinar la  $CL_{50}$  y los intervalos máximos y mínimos, de las concentraciones se utilizó el análisis Probit (US EPA, versión 1.5). Para presentar las diferencias entre los tratamientos y el grupo control para la mortalidad y el peso se realizaron gráficos de barras (paquete Excel Microsoft Office Ver. 2007). Para el tratamiento de datos del efecto tóxico sub letal, tales como las diferencias en tallas y pesos de los organismos tratados con el tóxico y el control se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía ( $P < 0.05$ ) (JMP 6). El análisis de datos sobre la conducta de los peces con respecto a la presencia de los peces en la columna de agua se hizo mediante una tabla de contingencia y se utilizó para ello el estadígrafo  $X^2$ . Con respecto a la respuesta de los peces al alimento se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía ( $P < 0.05$ ) y cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos se procedió con una prueba de Tukey.

## **6.- RESULTADOS**

### **6.1.- Efecto tóxico sub letal de los nitritos en crías de *S. multipunctata***

#### **Mortalidad**

En los resultados del efecto sub letal de los nitritos en las crías de *S. multipunctata*, el primer registro de mortalidad se presentó en la concentración 0.016 mg/L al día nueve de exposición y en la concentración 0.008 mg/L al día 12 (Figura 1). En el grupo control se registró una supervivencia de 100%. En las observaciones con microscopio estereoscopio de los organismos muertos, no mostraron hematomas en el cuerpo, sin embargo las branquias se mostraron edematizadas (Figura 2).

Las comparaciones entre los pesos de los peces del grupo control y los expuestos al tóxico (ANOVA de una vía) no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo control.

#### **6.1.2.- Histología branquial de crías de *S. multipunctata***

##### **Grupo control**

Las branquias correspondientes a los peces del grupo control no presentaron cambios en el transcurso de la exposición a los nitritos (Figura 3). Sus componentes estaban normales, con las lamelas primarias y secundarias separadas y claramente delimitadas, el eje cartilaginoso continuo y células cloro y pilar en forma y número acorde a las presentes en peces en estado de salud óptimo.

##### **Concentración 0.008 mg/L**

Las branquias de los peces expuestos a la concentración 0.008 mg/L de nitritos (Figura 4) mostraron cambios evidentes respecto a las branquias de los peces del grupo control. A partir del día 4 de exposición se comenzaron a notar ligeras alteraciones. Las lamelas secundarias tendieron a fusionarse, las células

cloro y pilar se observaron deformadas; sin embargo el eje cartilaginoso para este momento se presentó normal. Para el día 20 de exposición, las alteraciones fueron conspicuas; el eje cartilaginoso dejó de ser continuo, es decir se evidenció en segmentos aislados. Por su parte, las células cloro aumentaron en número y tamaño, las células pilar se deformaron y las lamelas secundarias se mostraron completamente fusionadas.

### **Concentración 0.016 mg/L**

Los cambios que evidenciaron en los peces del tratamiento 0.016 mg/L de nitritos fueron muy similares a los observados en la concentración 0.008 mg/L (Figura 5), aunque las alteraciones se presentaron en menor tiempo de exposición comparativamente con la concentración baja. A partir del día 12, el eje cartilaginoso se encontró de manera aislada, las células cloro y pilar aumentaron considerablemente en tamaño y número. Para el día 16, los cambios fueron notorios, estos incluyeron la pérdida de la estructura y función de la branquia, pues para este momento (final del experimento) la morfología de la branquia estaba completamente alterada.

### **6.1.3.- Conducta de las crías de *S. multipunctata* expuestas a nitritos**

En el experimento de conducta de *S. multipunctata* se registraron 315 minutos de grabación (105 minutos por tratamiento). Con respecto a la respuesta de los peces al alimento (número de peces activos durante cinco minutos) se grabaron y revisaron 315 minutos (105 minutos para cada tratamiento). En el grupo control un 80-90% de los organismos exhibió una alimentación activa que se mantuvo durante los 15 días de exposición. En los tratamientos 0.008 y 0.016 mg/L durante los primeros días de exposición la respuesta de los peces fue igual a los del grupo control, sin embargo a partir del día siete comenzó a disminuir el número de peces activos en ambos tratamientos (Figura 6 A).

Los resultados indicaron que no hubo diferencias entre los peces del grupo control (A) y del tratamiento 0.008 mg/L (AB); no obstante, la concentración 0.016 mg/L (B) fue significativamente diferente del grupo control ( $\alpha$ : 0.005).

En relación a la presencia de los peces en la columna de agua, durante los primeros siete días de exposición, los organismos tanto del grupo control como de los tratamientos no mostraron diferencias en su preferencia por la superficie, medio y fondo. La mayoría de los peces se mantuvieron en la parte media de la columna de agua. Para los peces del grupo control esta conducta fue constante a lo largo de todo el periodo experimental. Para los peces expuestos a las concentraciones 0.008 y 0.016 mg/L, después del día siete de exposición a los nitritos se ubicaron en la parte superficial o en el fondo de la columna de agua (Figura 6 B, C y D).

El análisis de los datos a través de la tabla de contingencia y de la prueba  $X^2$  hizo evidente que la presencia de los peces en la columna de agua fue dependiente de la concentración de tóxico ( $X^2$  calculado=97.02,  $X^2$  de tablas =14.86,  $\alpha$ : 0.005).

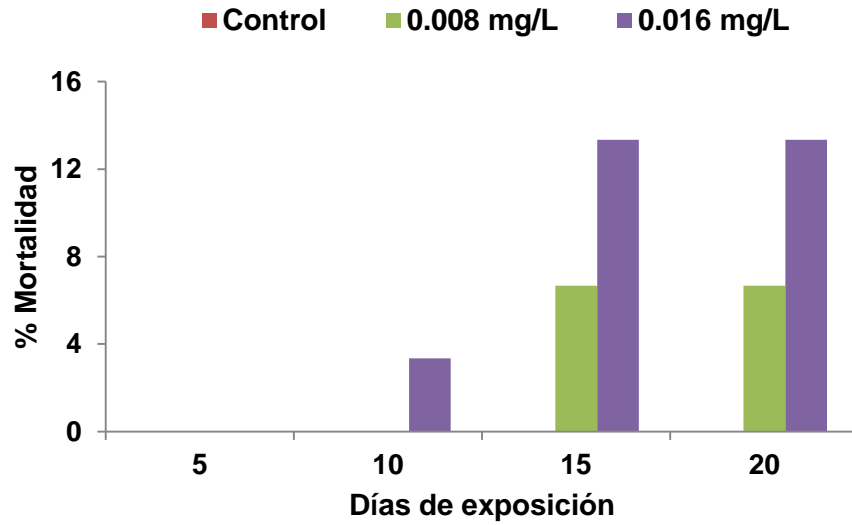


Figura 1.-Porcentaje de mortalidad de las crías de *S. multipunctata* en exposición al nitrito de sodio en el efecto tóxico subletal.

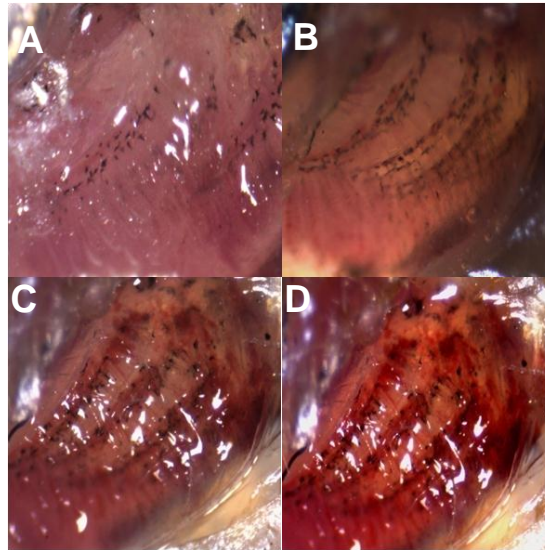


Figura 2.- Aspecto de branquias en crías de *S. multipunctata* expuestas a nitritos A) 0.00 mg/L, B) 0.016 mg/L por 9 días; C y D) 0.008 mg/L a los 11 y 13 días respectivamente.

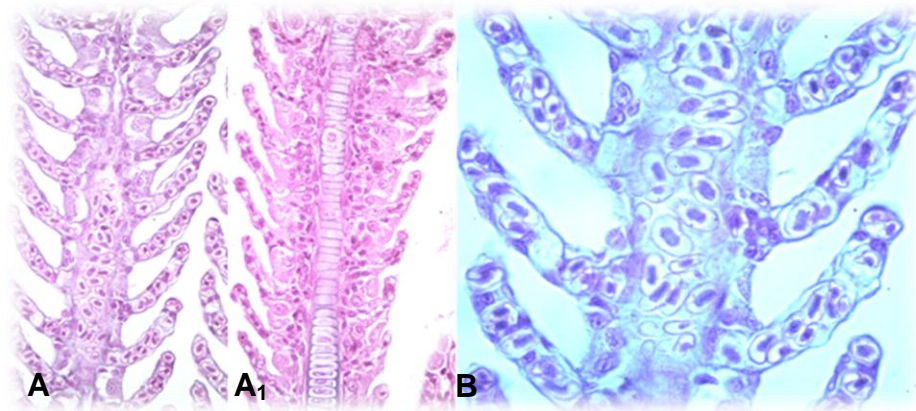


Figura 3.- Fotomicrografías de cortes longitudinales de branquias correspondientes al grupo control A y A<sub>1</sub>) inicio de exposición (40 y 100X respectivamente) y B) fin de exposición (100X).

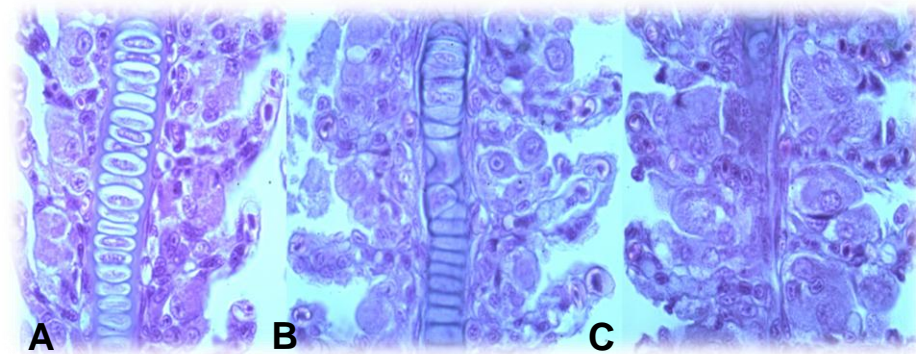


Figura 4.- Fotomicrografías de las branquias de los peces expuestos a la concentración 0.008 mg/L A) día cuatro (100 X), B) 16 (100X) y D) 20 de exposición (100X) respectivamente.

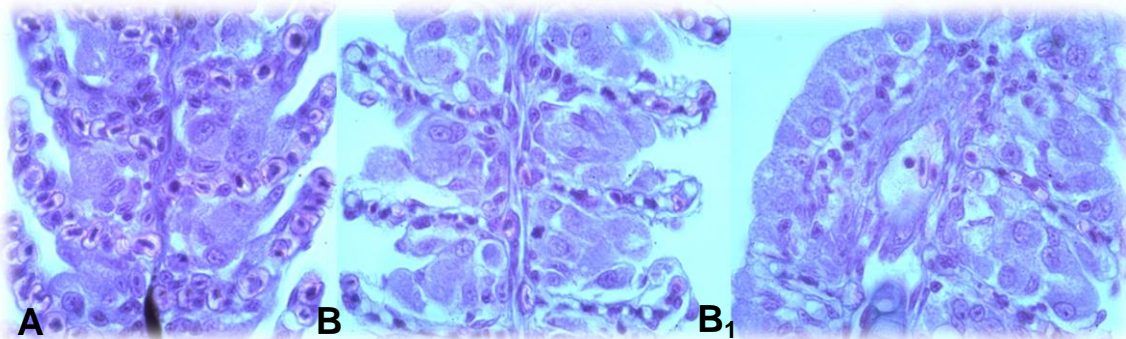


Figura 5.- Fotomicrografías de las branquias de peces expuestos a la concentración 0.016 mg/L A) día 12 (100X), B) 16 y B1) fusión de lamelas secundarias (100X).



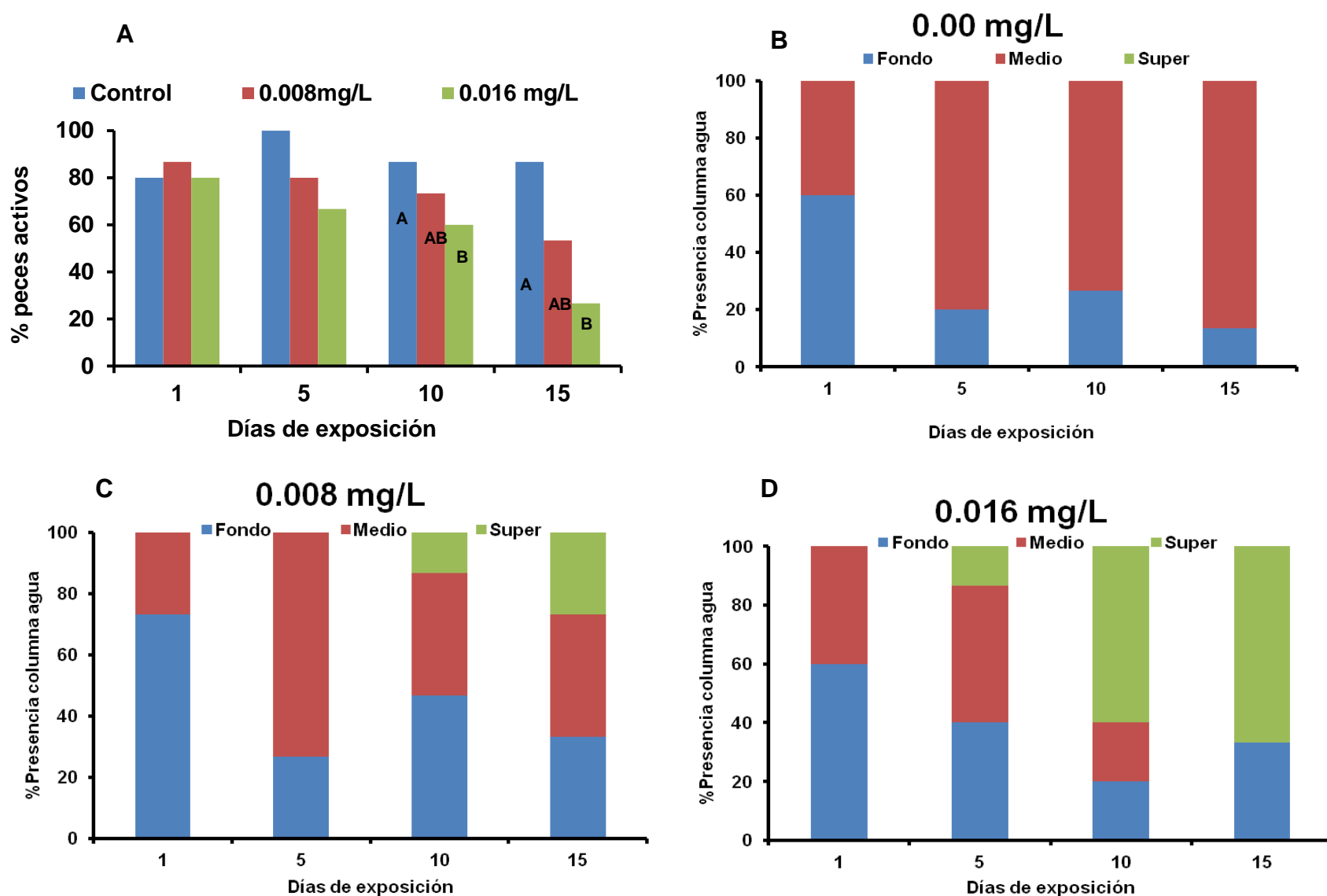


Figura 6.- Conducta de las crías de *S. multipunctata* A) activas durante alimentación, las letras denotan diferencias significativas. Porcentaje de las crías de *S. multipunctata* en la columna de agua a los días 1, 5, 10 y 15 de exposición a los nitritos B) Control, C) 0.008 mg/L, D) 0.016 mg/L.

## 6.2.- Comportamiento de las crías de *S. multipunctata* en exposición a los fosfatos

Durante este experimento se registraron 1170 min de grabación (390 min por tratamiento). A lo largo de los primeros once días de exposición, el comportamiento tanto de los peces del grupo control como de los expuestos al tóxico fue normal; para las crías libres del tóxico este comportamiento se mantuvo durante los 25 días de experimentación.

La respuesta de los peces al alimento fue activa para ( $\geq 80\%$ ) el grupo control durante todo el experimento. Por su parte, los peces expuestos al tóxico mostraron un comportamiento activo durante los 18 primeros días de exposición; a partir de éste momento disminuyó el número de peces alimentándose. Después de veinte de exposición el número de peces que se alimentaron activamente fue significativamente distinto entre los tratamientos ( $\alpha: 0.005$ ) (Figura 7 A) y los peces más afectados fueron los de la concentración 5.86 mg/L.

Con respecto a la presencia en la columna de agua, a partir del día doce, las crías expuestas a la concentración de 5.86 mg/L comenzaron a colocarse en la superficie y en el fondo del acuario, un comportamiento similar exhibieron los organismos de la concentración 3.08 mg/L aunque comparativamente fueron menos los organismos que mostraron tal comportamiento (Figura 7 B, C y D). El análisis estadístico (tabla de contingencia y prueba  $X^2$ ) reveló que la presencia de los peces en la columna de agua fue dependiente de la concentración del tóxico, ( $X^2$  calculado: 34.32 y  $X^2$  de tablas: 14. 9,  $\alpha 0.005$ ).

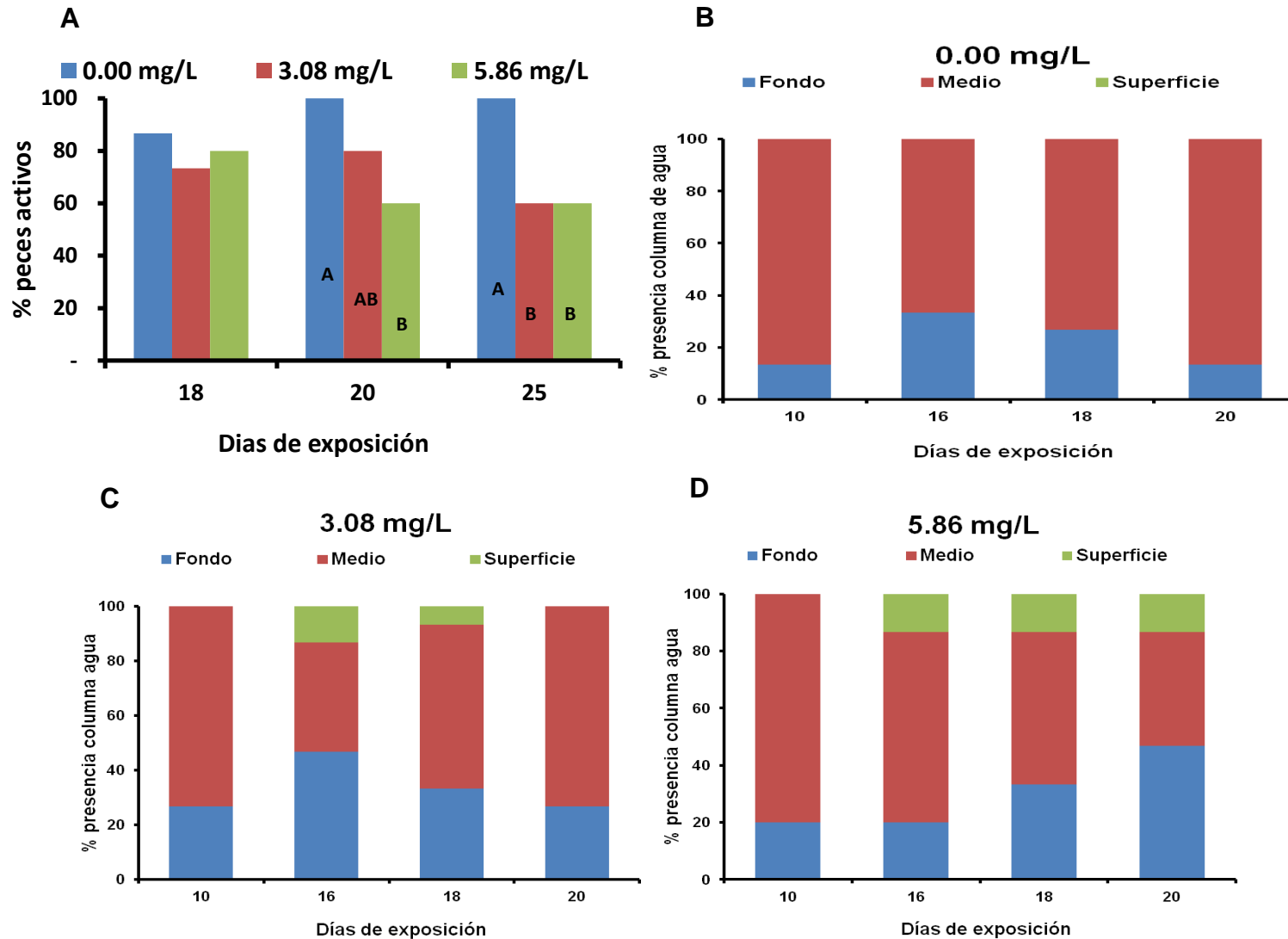


Figura 7.- Conducta de las crías de *S. multipunctata* en exposición a los fosfatos A) % de crías activas durante alimentación, las letras denotan diferencias significativas. Porcentaje de las crías de *S. multipunctata* en la columna de agua a los días 10, 16, 18 y 20 de exposición a los fosfatos B) Control, C) 3.08 mg/L y D) 5.86 mg/L.

### **6.3.- Efecto tóxico letal ( $cl_{50}$ ) de los nitritos en crías de *G. atripinnis***

#### **Mortalidad**

La mortalidad que se registró durante el experimento se muestra en la figura 8. Los primeros decesos ocurrieron en las concentraciones 6.5 y 12.03 mg/L en las tres primeras horas de exposición. En las concentraciones menores (0.28, 0.54, 1.03 mg/L) se presentaron a las 48 horas. En el grupo control no se registró mortalidad. Mediante el análisis Probit se determinó una  $CL_{50}$  2.03 mg/L-96 horas.

### **6.4.- Efecto tóxico sub letal de los nitritos en crías de *G. atripinnis***

#### **Mortalidad**

Durante los 26 días de exposición a los nitritos en el grupo control no se registró mortalidad, el primer registro se presentó en la concentración 1.79 mg/L al día diez de exposición; por su parte en la concentración 1.37 se presentó mortalidad hasta el día 25 de exposición al tóxico (Figura 9).

En cuanto a la comparación entre los pesos de los peces del grupo control *versus* los organismos expuestos al tóxico, se observó tendencia que favoreció al grupo control, sin embargo no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos.

#### **6.4.1.- Histología branquial de las crías de *G. atripinnis***

##### **Grupo Control**

Los cortes histológicos de las crías de *G. atripinnis* del grupo control en exposición a los nitritos revelaron la ocurrencia de branquias sin alteraciones (Figura 10). En las lamelas secundarias se observó una completa independencia, un número reducido de células cloro y pilar, así como un epitelio branquial sin inflamación evidente. Este aspecto de la branquia y sus componentes fue constante durante todo el periodo experimental.

### **Concentración 1.37 mg/L**

Los cortes histológicos de las crías expuestas a la concentración de 1.37 mg/L de nitritos evidenciaron organismos con alteraciones branquiales que se alternaron con algunos con branquias similares a las correspondientes al grupo control (normales). Fue hasta el día 14 que se observó la presencia de aneurismas, los días posteriores ya no se observaron. Posteriormente al día 18, 22 y 26 hubo una alternancia en las muestras analizadas, ya que fue posible observar fusión de lamelas secundarias, aumento en el número de células cloro y pilar e inflamación de epitelio, pero también branquias normales (similares a las del grupo control). Esta presencia de organismos con branquias alteradas y normales se observó hasta el final del periodo de exposición (Figura 11).

### **Concentración 1.79 mg/L**

Las crías de *G. atripinnis* expuestas a la concentración de 1.79 mg/L de nitritos evidenciaron branquias con lesiones entre las que se incluyeron: aneurismas, incremento en el número y tamaño de las células cloro y pilar así como una ligera inflamación del epitelio. Al día 14 de exposición se presentaron aneurismas, los cuales conforme avanzaron los días de exposición desaparecieron y se presentaron lamelas con aumento de células cloro y pilar, aunque también hubo presencia de lamelas similares a las correspondientes al grupo control (Figura 12).

#### **6.4.2.- Comportamiento de las crías de *G. atripinnis* en exposición a nitritos**

Para este experimento se registraron en total 660 minutos de grabación (220 minutos por tratamiento). Las crías de *G. atripinnis* del grupo control así como las de la concentración baja (1.49 mg/L) manifestaron un comportamiento semejante. Con respecto al número de peces activos durante la alimentación, tanto los peces del control como los de la concentración 1.49 mg/L no se vieron afectados, ya que el número de organismos activos fue constante durante todo el periodo experimental ( $\geq 80\%$ ). En la concentración 1.86 mg/L, el número de peces activos disminuyó notablemente al día 13

de exposición a los nitritos y fue significativamente distinto de los otros dos grupos ( $P < 0.05$ ) (Figura 13 A).

En cuanto a la presencia de los peces en la columna de agua, los peces de del grupo control así como los de 1.49 mg/L se colocaron en la parte media (60-55%) y el fondo (40-45) de la columna de agua y ningún organismo seleccionó la superficie de la columna de agua, este comportamiento fue constante durante todo el periodo experimental. En la concentración 1.86 mg/L, al día tres de exposición solo un pez optó por la superficie de la columna de agua y mantuvo el comportamiento por dos días. Sin embargo, fue hasta el día 10 que un mayor número de organismos mostró tal comportamiento y este se conservó hasta el final del experimento (Figura 13 B, C y D). Con base al análisis realizado de los datos, se tuvo que la presencia de los peces en la columna (1.86 mg/L) fue dependiente de la concentración del tóxico (valor  $\chi^2$  tabla: 14.86 ( $\alpha$ : 0.005) y valor  $\chi^2$  calculado: 53.261).

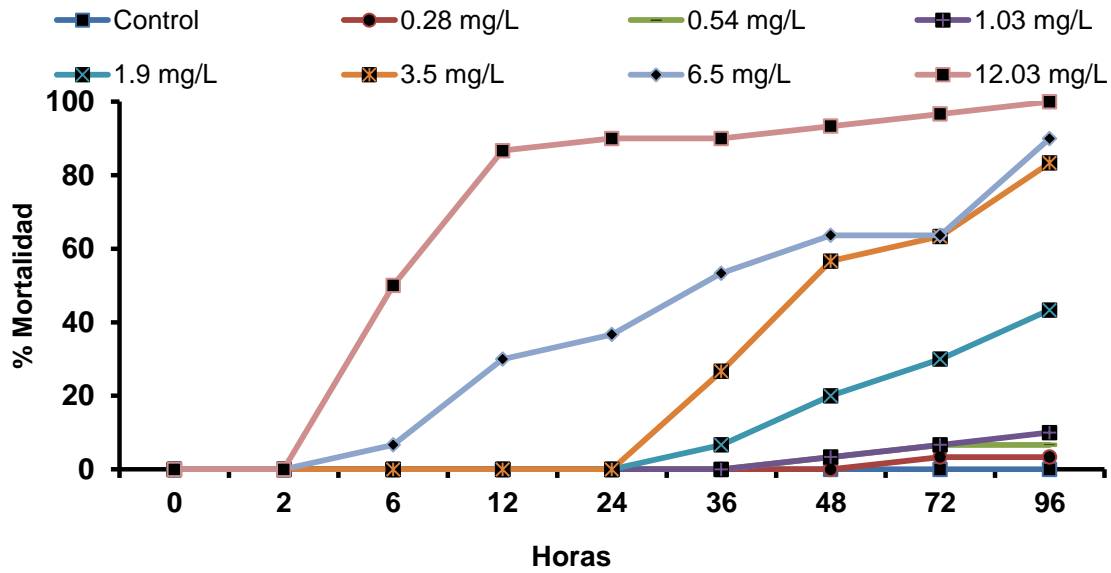


Figura 8.- Porcentaje de mortalidad en crías de *G. atripinnis* durante la exposición letal a los nitritos (0 – 96 horas).

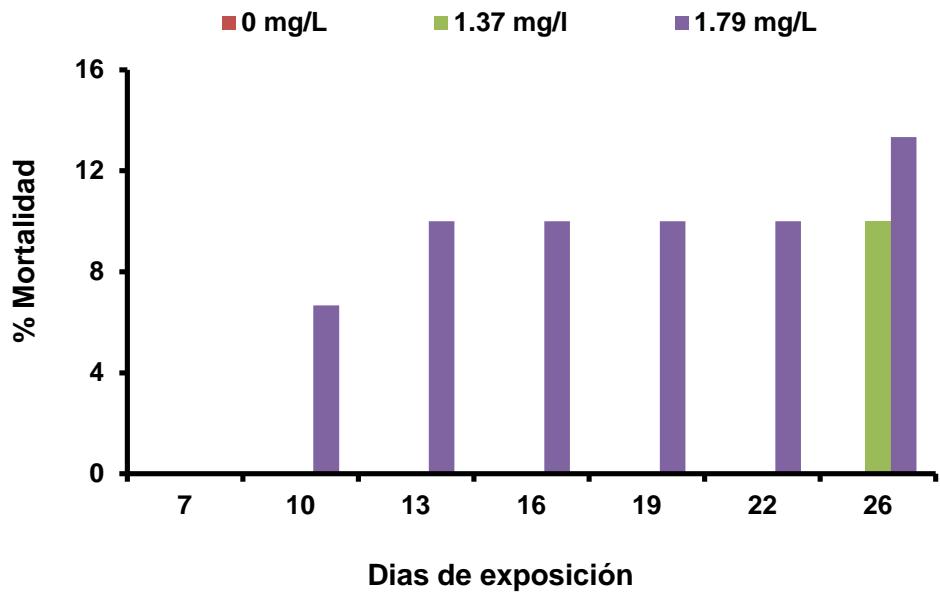


Figura 9.- Porcentaje de mortalidad de las crías de *G. atripinnis* durante la exposición sub letal al nitrito de sodio.

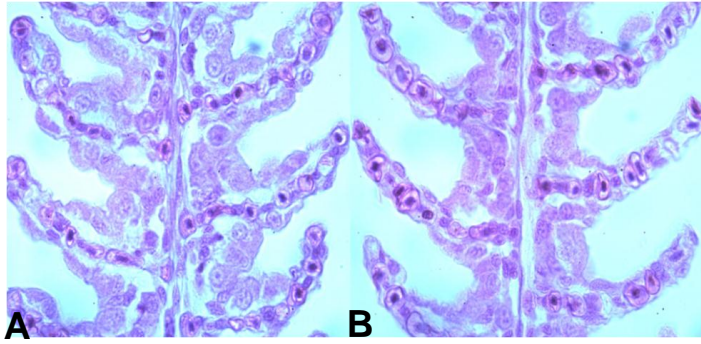


Figura 10.- Fotomicrografías de las branquias de las crías de *G. atripinnis* del grupo control A) al día 10 (100x) y B) día 20 (100x) en las que se aprecian branquias sin alteraciones.

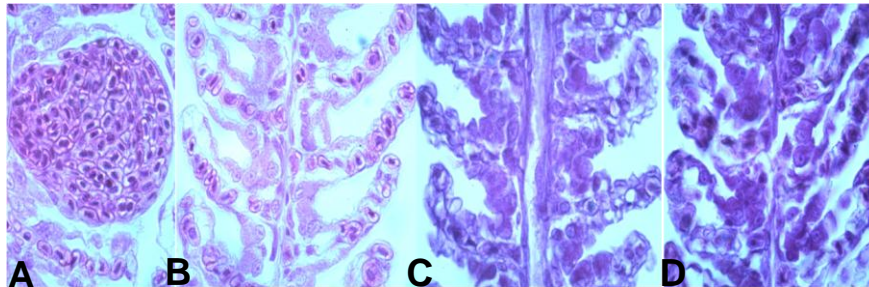


Figura 11.- Fotomicrografías de branquias de crías de *G. atripinnis* pertenecientes a la concentración de 1.37 mg/L donde se muestra A) aneurisma al día diez de exposición (100X), B) aspecto similar al control (100X) C) branquia con aumento de células cloro y pilar y también D) ligera fusión de lamelas secundarias.

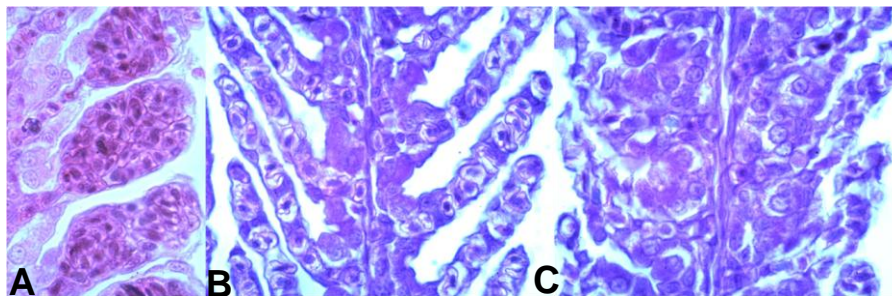


Figura 12.- Fotomicrografías de las crías de *G. atripinnis* en la exposición a la concentración 1.79 mg/L en donde se muestra A) la presencia de aneurismas (100x), B) aspecto de branquia semejante a la de grupo control y C) fusión de lamelas secundarias, incremento en el número de células cloro y pilar e inflamación de epitelio (100X).



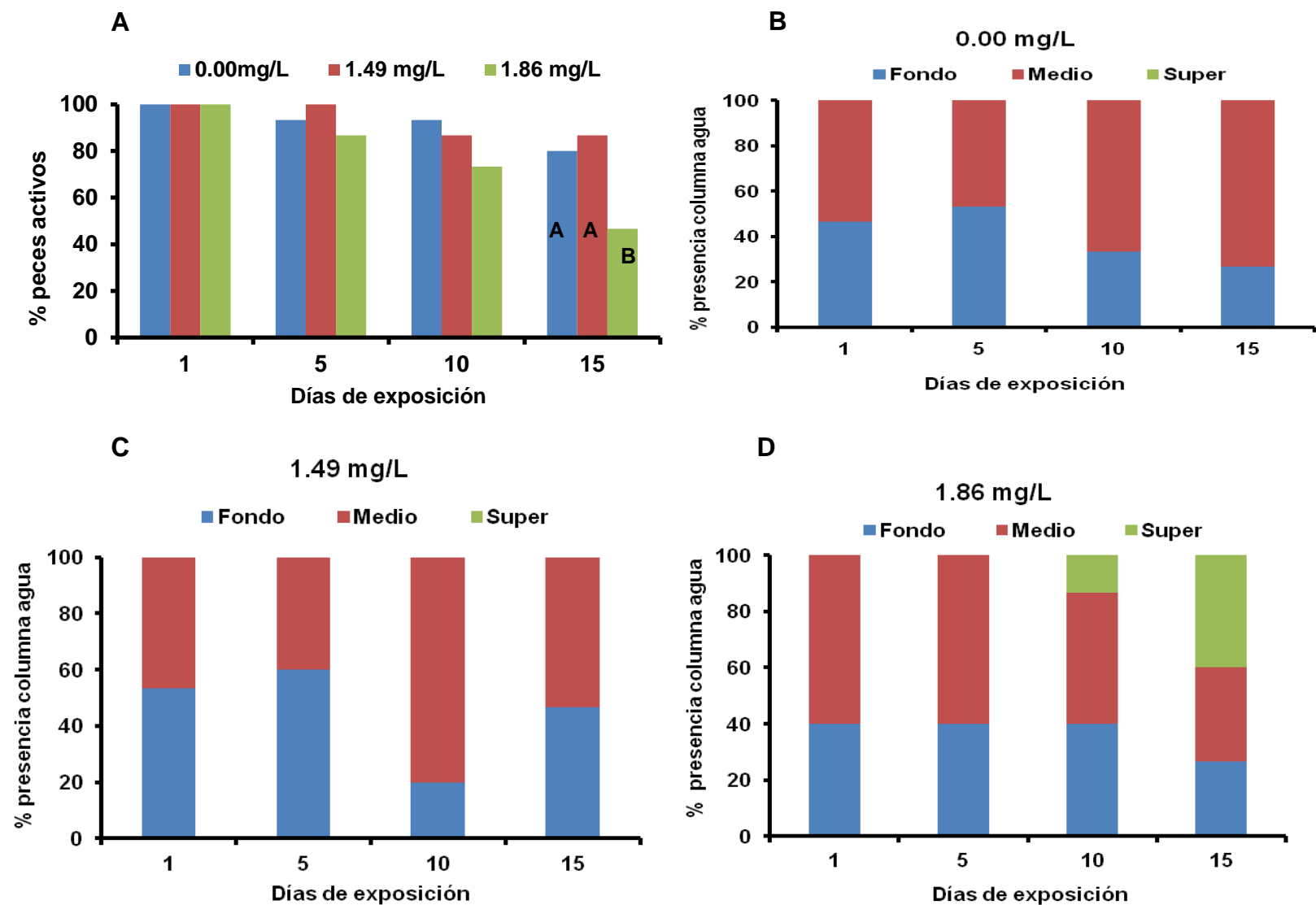


Figura 13.- Conducta de las crías de *G. atripinnis* en exposición a los nitritos A) % de crías activas durante alimentación, las letras denotan diferencias significativas. Porcentaje de las crías de *G. atripinnis* en la columna de agua a los días 1, 5, 10 y 15 de exposición a los nitritos B) Control, C) 1.49 mg/L y D) 1.86 mg/L.

### **6.5.- Efecto tóxico letal (CL<sub>50</sub>) de los fosfatos en crías de *G. atripinnis***

Los porcentajes de mortalidad durante la exposición de *G. atripinnis* a los fosfatos se presentan en la figura 14. En el grupo control no se exhibió mortalidad y las crías presentaron un comportamiento normal durante las 96 horas. Contrariamente, en la concentración 3853.6 mg/L se registró la primera mortalidad a las tres horas de exposición y en las concentraciones restantes las mortalidades se presentaron a partir de las 24 horas de exposición. A través del análisis Probit se obtuvo una CL<sub>50</sub> 96 h 3529.9 mg/L.

### **6.6.- Efecto tóxico sub letal de los fosfatos en crías de *G. atripinnis***

#### **Mortalidad**

En el experimento sub letal, durante el periodo de exposición de las crías de *G. atripinnis* a los fosfatos, el grupo control (0.00 mg/L de fosfatos) no presentó mortalidad. En el grupo expuesto a la concentración de 1160 mg/L, la primera mortalidad se presentó al día 12 y para la concentración de 1435 mg/L está ocurrió al día tres de exposición (Figura 15). Con respecto a las comparaciones de los pesos de los peces entre tratamientos, no se encontraron diferencias significativas entre ellos luego de 20 días de experimentación.

#### **6.6.1.- Histología branquial de las crías de *G. atripinnis* en exposición a fosfatos**

##### **Grupo control**

Los cortes histológicos de las crías de *G. atripinnis* expuestas a los fosfatos presentaron constituyentes branquiales sin alteraciones durante todo el transcurso del periodo experimental, aunque se pudo apreciar un ligero aumento en el número de células cloro (Figura 16).

### **Concentraciones 1160 y 1435 mg/L**

Los cortes de las branquias de los peces pertenecientes a las concentraciones de 1160 y 1435 mg/L presentaron constituyentes branquiales normales (Figura 17 A). Sin embargo, estos se alternaron con proliferación de células cloro y pilar, hinchazón del epitelio branquial y fusión parcial de lamelas secundarias (Figura 17 B). Esta alternancia entre branquias normales y afectadas por la presencia del tóxico se presentó durante todo el periodo experimental y fue similar para ambos tratamientos.

#### **6.6.2.- Comportamiento de las crías de *G. atripinnis* en exposición a fosfatos**

En el transcurso de exposición los peces del grupo control exhibieron un comportamiento normal y constante desde el inicio hasta el final de experimento. El porcentaje de peces expuestos a los fosfatos que se mantuvieron activos a la alimentación en los dos tratamientos fue superior al 80% (Figura 18 A), esto fue constante durante todo el periodo de experimentación y similar a los peces del grupo control.

Con respecto a la presencia de los peces en la columna de agua, tanto los peces de las concentraciones de 1160 y 1435 mg/L como los del grupo control se ubicaron mayormente en la parte media y el fondo de la columna de agua (Figura 18 B, C y D).

Los resultados encontrados para *S. multipunctata* y *G. atripinnis* en exposición a nitritos y fosfatos se resumen en la tabla 4 A y B respectivamente.

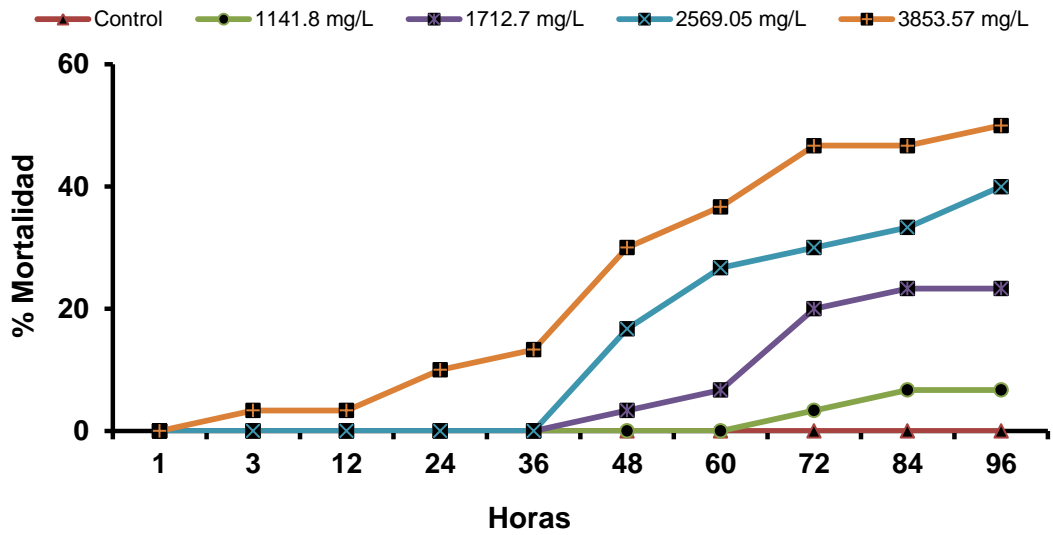


Figura 14.- Porcentaje de mortalidad en crías de *G. atripinnis* durante la exposición a los fosfatos.

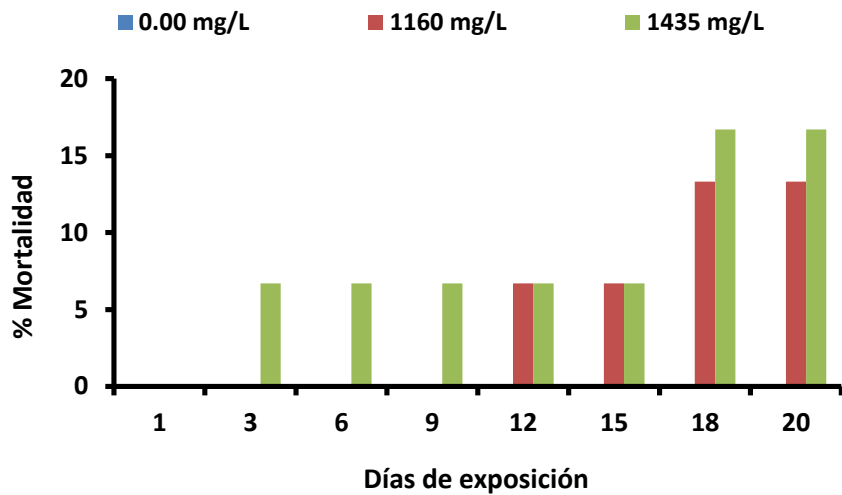


Figura 15.- Porcentaje de mortalidad de las crías de *G. atripinnis* durante la exposición al fosfato de sodio.

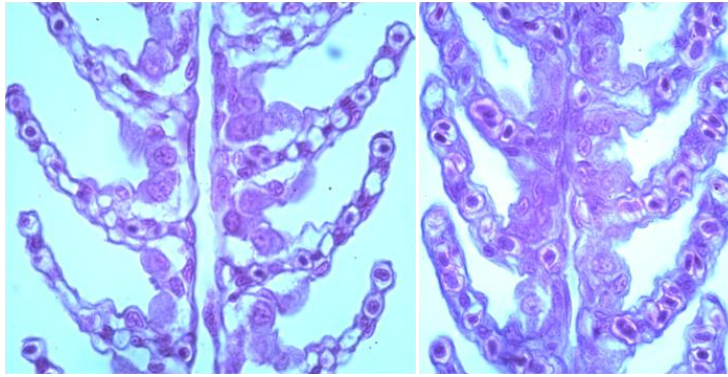


Figura 16.- Fotomicrografías de cortes longitudinales de branquias de las crías de *G. atripinnis* pertenecientes al grupo control.

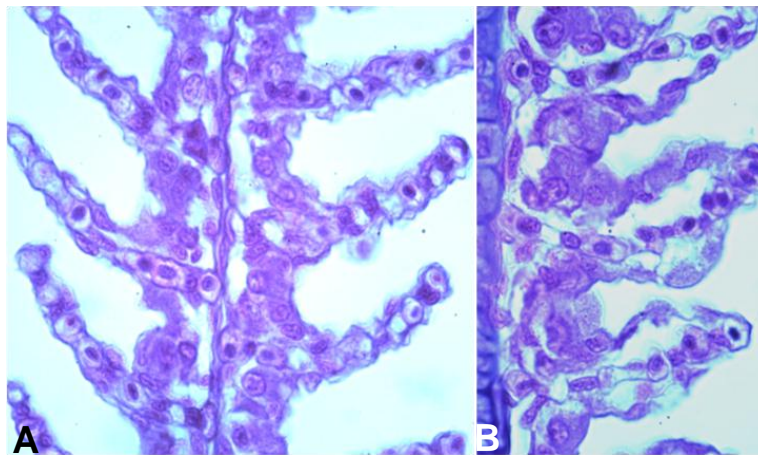


Figura 17.- Fotomicrografías de cortes longitudinales de branquias de crías de *G. atripinnis* expuestas a los fosfatos (1160 y 1435 mg/L) A) con sus componentes branquiales sin alteraciones y similares a los pertenecientes al grupo control, B) y ligera proliferación de células, hinchazón de epitelio y fusión lamelar parcial.

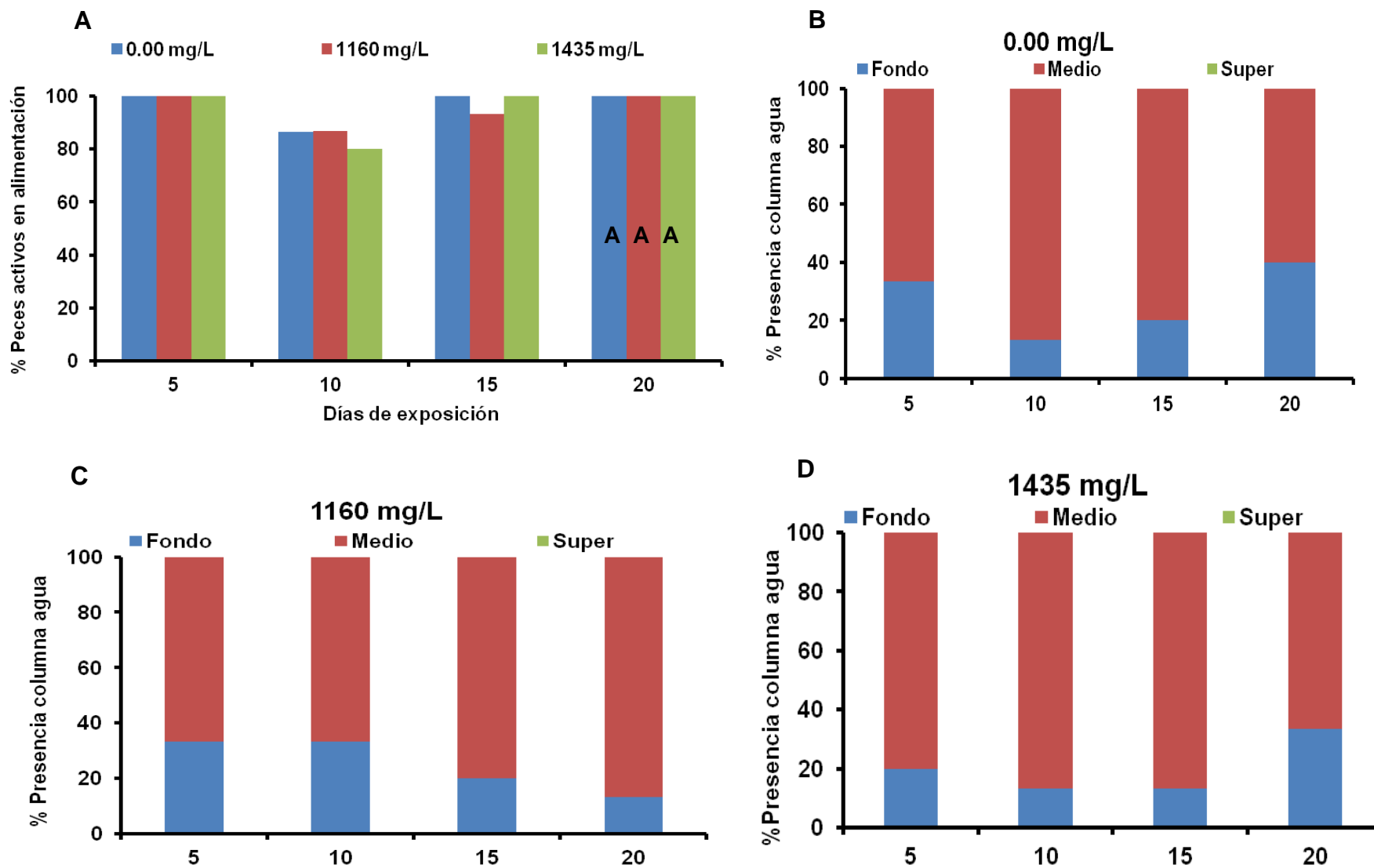


Figura 18.- Comportamiento de las crías de *G. atripinnis* en exposición a los fosfatos A) % de crías activas durante cinco minutos en alimentación. Porcentaje de las crías de *G. atripinnis* en la columna de agua a los días 5, 10, 15 y 20 de exposición a los fosfatos B) Control, C) 1160 mg/L y D) 1435 mg/L.

**Tabla 4 A.- Resumen de los efectos causados por nitritos en crías de *S. multipunctata* y *G. atripinnis***

<b>EFFECTOS</b>  <b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	<b><i>Skiffia multipunctata</i></b>	<b><i>Goodea atripinnis</i></b>
<b>LC<sub>50</sub></b>	0.064 mg/L 24 h	2.03 mg/L 96 h
<b>Experimento de conducta (concentraciones usadas)</b>	0.00, 0.008 y 0.016 mg/L	0.00, 1.49 y 1.86 mg/L
<b>Presencia en superficie (%de peces)</b>	0.00 mg/L - 0% 0.008 mg/L - 26% 0.016 mg/L - 66%	0.00 - 0% 1.49 mg/L - 0% 1.86 mg/L - 40%
<b>Actividad en alimentación (% de peces activos)</b>	0.00 mg/L > 85% 0.008 mg/L ≤ 73% 0.016 mg/L < 30%	0.00, > 85% 1.49 mg/L > 85% 1.86 mg/L ≤ 73%
<b>Histología branquial</b>		
<b>Células cloro y pilar (% de peces afectados)</b>	Aumento y deformación (90%). Se presentan al inicio de exposición	Aumento y deformación (50%) al final de exposición % restante de las crías similar al grupo control
<b>Lamelas secundarias (Fusión)</b>	En menor tiempo a mayor concentración	Al final del periodo de exposición, sólo 50% de organismos afectados
<b>Presencia de aneurismas</b>	Ausencia	Presencia sólo al inicio de exposición

**Tabla 4 B.- Resumen de los efectos causados por fosfatos en crías de *S. multipunctata* y *G. atripinnis***

<b>EFFECTOS PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	<b><i>Skiffia multipunctata</i></b>	<b><i>Goodea atripinnis</i></b>
<b>LC<sub>50-96 h</sub></b>	13.18 mg/L	3529.88 mg/L
<b>CONDUCTA</b>		
<b>(concentraciones usadas)</b>	(0.00, 3.08 y 5.86 mg/L)	(0.00, 1160 y 1435 mg/L)
<b>Presencia en superficie (%de peces)</b>	0.00 mg/L (0%) 3.08 mg/L (13.33%) 5.86 mg/L (20%)	0.00, 1160 y 1435 mg/L = 0%
<b>Actividad en alimentación (%de peces activos)</b>	0.00 mg/L >85% 3.08 mg/L ≥ 73% 5.86 mg/L ≥ 60%	0.00, 1160 y 1435 ≥ 85%
<b>HISTOLOGÍA BRANQUIAL</b>		
<b>Células cloro y células pilar (% de peces afectados)</b>	Aumento y deformación (90%), se presentan a mitad de exposición	Ligera proliferación de células en dos concentraciones. También sin alteraciones similar a control
<b>Lamelas secundarias (Fusión)</b>	En menor tiempo a mayor concentración	Fusión parcial al final de exposición
<b>Presencia de aneurismas</b>	Ausencia	Ausencia



## 7.- DISCUSIÓN

Las actividades humanas han afectado a todos los ecosistemas del planeta y sus consecuencias ocurren con una alta frecuencia en periodos cortos y son de baja, mediana y alta intensidad, por lo que en la mayoría de los casos no se permite la recuperación de los mismos. Los ecosistemas acuáticos no son la excepción y también se enfrentan a graves desequilibrios causados por el hombre. Una consecuencia directa de las actividades humanas ha sido el aumento en las concentraciones de nitrógeno y fósforo en sus diversas formas.

Los nitritos, nitratos y los demás derivados del nitrógeno, tienen un efecto tóxico en diversas especies. Particularmente para peces existe amplia información con respecto al efecto de estos en especies con importancia en la piscicultura (Jensen 1990, Kroupova *et al.* 2005, Evans *et al.* 2006). Sin embargo, con respecto a la toxicidad de los fosfatos es escaso el conocimiento de su efecto, no obstante, existe vasta información de las consecuencias negativas de detergentes y plaguicidas organofosforados, que entre sus componentes incluyen a este ion, aunque la mayoría de éstos se han enfocado en peces tolerantes (Zeni *et al.* 2001) y sólo algunos autores han reportado el efecto en especies endémicas como los peces goodeídos (Arellano y Macías 2008, Vega-López *et al.* 2009).

### 7.1.- *Skiffia multipunctata* y *Goodea atripinnis*

La respuesta a contaminantes es distinta entre especies (Lewis y Morris 1986, Bindon *et al.* 1994, Jensen 2003, Kroupova *et al.* 2005, Edwards *et al.* 2006, Schreck *et al.* 2010). Esto es resultado de la susceptibilidad de cada especie e individuo, de los mecanismos fisiológicos propios, así como de su capacidad de adecuación a un ambiente cambiante (Schreck *et al.* 2001). Los resultados encontrados en el presente estudio explican el porque *G. atripinnis* es una de las especies de goodeídos con mayor abundancia y amplitud de distribución (De la Vega Salazar 2005) y del porque esta especie no se encuentra actualmente en ninguna normativa para su protección. Cabe mencionar que los sitios de muestreo de los progenitores son ambientes degradados (en el bajo Lerma y el canal del lago de Zacapu). En contraparte, *S. multipunctata*

actualmente es una especie bajo protección (De la Vega-Salazar 2005, Jelks *et al.* 2008, NOM-059 SEMARNAT 2010). Lo anterior refleja su susceptibilidad a los diversos cambios (pérdida de hábitat y degradación ambiental) que han generado la disminución de su área de distribución. El sitio de origen de los progenitores (manantial de La Luz) es un ambiente conservado. Lo anterior coincide con lo propuesto por Huidobro (2000), quien propone a *S. multipunctata* como especie indicadora de buena calidad ambiental.

## 7.2.- Tejido branquial y conducta

Otro aspecto en el que se manifestó la distinta sensibilidad entre especies (*S. multipunctata* y *G. atripinnis*) y respuesta a la toxicidad que ejercen los nitritos y fosfatos, fue en las alteraciones al tejido branquial. En los peces, la branquia es un órgano multifuncional, ya que es indispensable para el intercambio gaseoso, la regulación iónica, regulación ácido base y la excreción de desechos nitrogenados (Jensen 2003, Evans 2005). El estado óptimo de éste órgano así como de sus componentes celulares es esencial para que dichas funciones se lleven a cabo correctamente. Sin embargo, la branquia es un órgano altamente sensible a los agentes contaminantes que se encuentren en el agua, ya que branquia-agua se encuentran en contacto directo y permanente, lo que la convierte en un órgano blanco para muchos tóxicos.

Independientemente de la naturaleza del contaminante, la branquia reacciona de un modo similar en cuanto a los efectos histológicos visibles. Entre estas alteraciones se incluyen: hiperplasia con fusión lamelar, hipertrofia epitelial, telangiectasias, edemas, necrosis generalizada y descamación epitelial (Evans 1986, 2005, 2006). Cuando los contaminantes alteran la morfología de este órgano, ocurren perturbaciones fisiológicas que comprometen el adecuado funcionamiento del órgano y en consecuencia del organismo y dependiendo del grado de afectación pueden incluso poner en riesgo su vida. Diversos autores han reportado alteraciones similares que diversos contaminantes ejercen sobre la branquia. Para la carpa común (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) en exposición a cadmio se reportaron deformaciones y edemas en lamelas primarias y

secundarias así como fusión, levantamiento y desprendimiento de células mucosas (Ferrati 2010). Para la lisa (*Mugil cephalus*, Linnaeus 1758) se presentó hipertrofia, hinchazón y proliferación de células cloro, así como desprendimiento de epitelio y fusión de lamelas secundarias. Estas alteraciones fueron ocasionadas por la exposición del pez a aguas residuales procedentes de industrias de productos químicos (Chezhian *et al.* 2010).

En las crías de *S. multipunctata*, la alteración más conspicua y constante fue la proliferación de células cloro, algo que no ocurrió en *G. atripinnis*. Dichas células desempeñan un papel clave en el equilibrio iónico ya que toman del agua  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  buscando alcanzar un equilibrio osmótico. Las células cloro son indispensables para el óptimo desempeño del intercambio gaseoso y en caso de existir presiones ambientales ionoregulatorias incrementan su número y tamaño (Perry 1998). Cuando se presenta una proliferación de células cloro se ve comprometida la transferencia de gas en la branquia, ya que esto ocasiona un incremento en el espesor de la barrera de difusión sangre-agua (Perry 1998). Con ello se aumenta la superficie lamelar, lo que garantiza una mayor área para ser irrigada por agua y aumentar la captación de oxígeno ( Bindon *et al.* 1994). Sin embargo, el aumento de la superficie lamelar afecta la eficiencia del flujo de agua a través de la branquia, ya que se reduce el espacio entre lamelas secundarias que es donde se realiza el intercambio gaseoso.

*S. multipunctata* presentó estas mismas alteraciones: proliferación de células cloro, posteriormente alteraciones morfológicas de las mismas y finalmente una completa fusión branquial, resultado de la hiperplasia de las lamelas secundarias. En su conjunto, estas alteraciones impidieron un eficiente intercambio gaseoso y se evidenciaron con las alteraciones conductuales como la hiperventilación, la cual se considera una respuesta de mitigación ante la captación ineficiente de oxígeno (Perry 1998).

En las crías de *G. atripinnis* hubo gran diferencia en la respuesta entre individuos, ya que algunos peces mostraron alteraciones histológicas tales como ligera proliferación de células cloro y fusión de lamelas secundarias. Los peces que mostraron

este tipo de alteración en las branquias pudieran ser los que manifestaron las anomalías conductuales en exposición a los nitritos, sin embargo, con nuestros resultados no es posible asegurar y relacionar tales efectos. No obstante, también se observaron organismos sin alteraciones, en los cuales el tejido branquial fue similar al presentado por peces del grupo control. Lo anterior puede explicarse por la variabilidad intraespecífica (Aggergaard y Jensen 2001) ya que incluso peces del mismo acuario expuestos a la misma concentración de tóxico mostraron diferente respuesta. Estas diferencias en la respuesta se presentaron tanto en crías de *S. multipunctata* como *G. atripinnis*, aunque en esta última las diferencias intraespecíficas fueron más marcadas.

La diferente respuesta expresada por individuos de la misma especie se ha hecho también evidente en especies como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) expuestas a nitritos (Aggergaard y Jensen 2001). Diversos autores (Stormer *et al.* 1996, Aggergaard y Jensen 2001 y Schreck 2010) han expresado que las diferencias inter e intraespecíficas pueden deberse a: a) la capacidad de captación que existe entre las especies de peces e b) individuos de la misma especie, c) al número y tamaño que alcanzan las células cloro durante la exposición y d) a los mecanismos de desintoxicación y eliminación presentes en los organismos. Por ejemplo, el aumento de las células cloro puede potenciar la captación de un contaminante. Otro aspecto fisiológico importante es la conversión bioquímica de contaminantes nocivos a formas menos tóxicas para los peces. Éstas características pueden ser las estrategias que siguen las especies adaptadas a vivir en sitios degradados. Este es el caso de *G. atripinnis*, que por su tolerancia y capacidad de adecuación esta presente en sitios con niveles elevados de contaminación como la Presa La Vega (río Ameca) (López-López y Paulo-Maya 2001, Tejera-Vera *et al.* 2007).

Cuando los peces (como todos los organismos que necesitan oxígeno para vivir) reciben un suministro insuficiente del gas para atender las funciones vitales esenciales, se pueden manifestar diversas conductas para lograr la captación del oxígeno y garantizar así su supervivencia (Kramer 1987). Entre las principales respuestas mostradas por los peces para obtener el oxígeno se tienen: 1) cambios en la actividad muscular, 2) búsqueda de aire atmosférico (para peces capaces de respirar de esta

forma) y 3) preferencia por la parte superficial de la columna de agua (Kramer 1987, Heath 1995). De igual forma existen mecanismos endógenos que tratan de mitigar el problema de la captación de oxígeno, entre ellos se encuentra la liberación de hormonas (cortisol, prolactina, catecolaminas, somatostatina, glucagón, entre otras) que pueden modificar la estructura del epitelio branquial a través del incremento en el número, estado de diferenciación y tamaño de las células cloro (Foskett 1983).

Durante el transcurso del periodo experimental en los tratamientos se tuvieron condiciones adecuadas de oxigenación (> 6 mg/L), lo que nos hace inferir que los peces, particularmente las crías de *S. multipunctata*, no podían incorporar el gas aún cuando estaba disponible en los acuarios y que las alteraciones histológicas ya señaladas fueron las responsables de la falla en la captación. Otro aspecto relevante es el efecto tóxico de los nitritos por su capacidad para formar metahemoglobina. Una vez que los nitritos han sido incorporados a los eritrocitos tienen la capacidad de oxidar al hierro y con ello la hemoglobina es convertida a metahemoglobina, lo que impide el transporte eficiente de oxígeno en sangre (Galaviz *et al.* 2010). Aunque en el presente trabajo no se evaluaron los niveles de metahemoglobina se deduce que estos fueron elevados y que probablemente también se vio superada la producción normal de la enzima metahemoglobin reductasa, la cual convierte metahemoglobina a hemoglobina (Lewis y Morris 1986, Jensen 2003). Esto también pudo agudizar las alteraciones conductuales presentadas por los organismos expuestos.

El efecto de los niveles de metahemoglobina han sido evaluados en el salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*, Walbaum 1792) y se ha demostrado que altos niveles de metahemoglobina disminuyen la actividad de nado. Lo anterior debido a que la tasa de consumo de oxígeno aumenta con la velocidad del nado, ya que la potencia necesaria para la natación es dada por la musculatura propulsora, que es alimentada por el oxígeno (Brauner *et al.* 1993).

Los cambios evidentes en la alteración de conducta se correspondieron con las alteraciones a nivel branquial en las crías de *S. multipunctata* (cortes histológicos) y *G. atripinnis*. Si bien, en todos los parámetros evaluados *S. multipunctata* fue la especie

más afectada y los nitritos ocasionaron el efecto tóxico más severo en comparación con los fosfatos. Esta correlación entre los cambios en la conducta y las afectaciones a nivel de la branquia fue lo suficientemente evidente y constante que podría permitir en el futuro utilizar los cambios conductuales como un indicador de una afectación fisiológica. Para ello es esencial conocer el comportamiento del organismo en óptimo estado de salud, así como su respuesta fisiológica y conductual ante diversos contaminantes. Lo anterior facilitaría que a través de la detección de alteraciones de la conducta se identificaran indirectamente los cambios ambientales. Lo que situaría al comportamiento como una herramienta útil para identificar la exposición a contaminantes.

La toxicidad y agresividad de los derivados del nitrógeno (amonio, nitritos y nitratos principalmente) se han hecho evidentes en numerosos trabajos (Lewis y Morris 1986, Jensen 1990, 2003, Svobodova *et al.* 2005, Camargo *et al.* 2005). Sin embargo, el efecto que los derivados del fósforo ejercen en organismos acuáticos es escaso. Su papel es generalmente asociado a sus efectos secundarios relacionados a la eutroficación. En la misma línea, los plaguicidas organofosforados, que entre sus componentes incluye al fósforo, ejercen un papel tóxico muy conocido y entre estos destacan: inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en el sistema nervioso (Quy *et al.* 1997, Fulton y Key 2001), alteración de dimorfismo sexual y del comportamiento en la reproducción (Arellano-Aguilar y Macías-García 2008). Adicionalmente, estos contaminantes tienen capacidad de bioconcentrarse en la cadena trófica (De la Vega-Salazar *et al.* 1997, Favari *et al.* 2002).

Fisiológicamente, el fosfato desempeña un papel vital en la generación de energía ya que es constituyente indispensable del ATP, la molécula que da la energía necesaria para todas las reacciones químicas. Una forma rápida para compensar ante bajos niveles de oxígeno (anemia e hipoxia) es mediante ajustes a nivel de ATP y GTP, lo que causa que se provea de oxígeno a los tejidos (Val 2000). Sin embargo, los mecanismos involucrados en estos ajustes son aún desconocidos.

En los peces expuestos a los fosfatos, las alteraciones fueron mínimas cuando se compararon con el efecto que ejercieron los nitritos. Aún cuando los resultados arrojados en el presente estudio comprueban que su efecto no es severo es de vital

importancia seguir investigando su papel fisiológico y conocer sus efectos negativos ya que es un contaminante común a los ecosistemas acuáticos donde habitan los peces goodeídos.

### 7.3.- Especiación química: complejidad del nitrógeno

El ciclo del nitrógeno es de vital importancia en todos los ecosistemas ya que en gran medida de la presencia de éste en las cantidades y especies químicas adecuadas depende su bienestar. Sin embargo es un ciclo complejo, en que el elemento tiene una variedad de especies químicas con distintos estados de oxidación (desde -3 hasta +5) ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$ , nitrógenos orgánicos disuelto-péptidos, purinas, aminas, aminoácidos). La conversión entre sus formas es susceptible a ligeras variaciones, además de que las reacciones se llevan a cabo en tiempos cortos (Schlesinger 2008).

En el presente trabajo, el nitrito de sodio fue la sal empleada para realizar la solución a probar en la toxicidad del nitrito. Debido a las particularidades que presenta el nitrógeno en los sistemas acuáticos se hizo la modelación considerando los parámetros evaluados en los acuarios experimentales. Como resultado se obtuvo una serie de especies químicas derivadas del nitrógeno, que estuvieron en el orden de magnitud siguiente:  $\text{NH}_4 > \text{HNO}_2 > \text{NO}_3^- > \text{NO}_2^-$ . Si bien el nitrito no apareció en mayor concentración, sino que fue el ion en menor concentración en la modelación realizada, esto no es indicativo de que los efectos negativos ejercidos en los organismos no sean a causa de éste. Por su inestabilidad se puede entender que no se encuentre en todo momento en el sistema o que si ocurre sea a niveles mínimos, sin embargo, el ion tiene una documentada toxicidad a concentraciones bajas. Además se ha reportado que es el responsable de desencadenar una serie de alteraciones fisiológicas en el organismo que lo pueden llevar a la muerte. Conjuntamente, en diversos trabajos se ha documentado la acumulación del ion en músculo e hígado del pez lucio (*Sander lucioperca* Linnaeus 1758) (Wuertz *et al.* 2013). En nuestro trabajo no se cuantificó la

acumulación del ion en el organismo, lo que no nos permite descartar la presencia del ion dentro del pez y que consecuentemente pudiese mermar la concentración estimada.

Por estas características propias del ciclo del nitrógeno en los sistemas acuáticos, es preciso hacer un seguimiento puntual de las interacciones que se dan en el sistema para entender y representar claramente lo que ocurre. Comparativamente, el ciclo del fósforo es sencillo y la única especie química en que se encuentra disponible en las aguas naturales es el  $\text{PO}_4^{3-}$  (Conzonno 2009).

Los efectos negativos (mortalidad, histología branquial y conducta) en los peces estudiados ocurrieron en las concentraciones mayores de nitrito de sodio en menores tiempos de exposición. Esta respuesta dosis dependiente por la adición de nitrito de sodio y la ausencia de alteraciones en los peces del grupo control, nos permite suponer que fueron los nitritos los causantes de los efectos anteriormente mencionados. Cabe resaltar que los efectos fueron evaluados en un sistema experimental bajo condiciones controladas donde la única variable entre tratamientos fue la dosis agregada de nitrito y fosfato de sodio respectivamente. Consecuentemente los resultados de la presente investigación deben ser tomados con reserva al comparar lo que podría ocurrir en campo a los organismos expuestos.

En los sistemas acuáticos naturales existe una compleja interacción entre factores bióticos y abióticos. Particularmente para el nitrógeno es imposible separar sus efectos de otras entradas de contaminantes o estresores (Rabalais 2002). Actualmente la mayoría de los cuerpos de agua presentan: problemas de acidificación, eutroficación, metales pesados etc., solo por citar algunos. (Vitousek *et al.* 1997). Estos al combinarse con los derivados del nitrógeno podrían causar efectos sinérgicos o antagónicos. Por lo anterior es indispensable estudiar las interacciones de distintos contaminantes en campo que son las situaciones reales a las que están expuestos los organismos. Sin embargo se debe resaltar la complejidad de tales estudios pues existen numerosas variables ambientales que repercutirán en la integridad de los ecosistemas.



Tanto el nitrógeno y el fósforo son elementos de vital importancia en los ecosistemas acuáticos. Para ambos compuestos sus niveles son variables en el tiempo, debido a las condiciones ambientales cambiantes, aunque son los valores elevados los que comprometen la supervivencia de las especies expuestas a ellos.

#### **7.4.- Normativa nacional e internacional para los compuestos nitrogenados y fósforo**

En comparación con los estándares de calidad de agua establecidos para la protección de la vida acuática de otros países, los límites propuestos por la Norma Oficial Mexicana 001 (que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales) son valores elevados para nitrógeno y fósforo total. En lo respectivo al nitrógeno, la Norma Oficial Mexicana establece sus valores considerando al nitrógeno total (suma de nitrógeno orgánico,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ), en tanto que en la Normativa Canadiense los valores son para amonio ( $\text{NH}_3$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), además de que no considera al amonio total ( $\text{NH}_3$  y  $\text{NH}_4^+$ ) como un valor fijo. Esto es debido a que en la dinámica del ciclo del nitrógeno existe el impacto de factores tales como pH y temperatura, los cuales son importantes en su proceso y van a influir en las especies químicas presentes y su concentración. En la normativa de la Unión Europea los parámetros considerados son nitritos, amonio y amoniaco. Por su parte, Australia y Nueva Zelanda consideran al nitrógeno inorgánico y Gran Bretaña basa sus normas en relación a  $\text{NH}_3$  y  $\text{NH}_4$ . Estados Unidos además considera al  $\text{NO}_2^-$  y la Norma de la Republica de Chile establece al  $\text{NH}_4$  y  $\text{NO}_2^-$  (Tabla 5).

Con respecto al fósforo, la NOM considera al fósforo total como el parámetro a evaluar para garantizar la protección de vida acuática. Los países que en sus estándares de calidad de agua establecen valores para este nutriente son Australia y Nueva Zelanda (Tabla 6). Las normativas de los países restantes no establecen valores para el fósforo, sino que consideran los estados tróficos de los cuerpos de agua (Tabla 7). Por ejemplo en los lineamientos de calidad de agua para la protección de vida acuática de Canadá, actualmente no existen valores de calidad de agua para el fósforo, dicha normativa señala que cada provincia puede tener sus lineamientos y objetivos. Lo

anterior debido a que el fósforo no es considerado tóxico para los organismos acuáticos, pero se considera que se deben mantener los estados tróficos de los cuerpos de agua (para cada cuerpo de agua en particular). Asimismo cuando los niveles son excedidos se realizan pruebas adicionales y se busca recuperar la calidad del cuerpo de agua. Lo anterior aplica para Estados Unidos, Gran Bretaña y la Unión Europea.

En comparación con las normas de los países antes mencionados, se hace evidente que México es uno de los países con los valores más elevados en cuanto a los parámetros considerados en la calidad del agua para la protección de la vida acuática. En el caso específico del nitrógeno es deseable que en la NOM considere otras especies químicas debido a la complejidad que presenta éste elemento en el medio, además de que la toxicidad de derivados del nitrógeno (amonio, nitrito y nitrato principalmente) está ampliamente probada en peces.

En lo que respecta al fósforo, la NOM considera al fósforo total para la protección de la vida acuática, dicho criterio parece ser deseable en comparación con las normativas de otros países, ya que éste ion no presenta riesgo de toxicidad, sus efectos negativos son secundarios y se encuentra asociado a la eutroficación. No obstante, es ideal mantener el estado trófico de referencia de los cuerpos de agua, lo que conlleva a la necesidad de que se disminuyan los aportes de fósforo procedentes de entradas puntuales. Otro aspecto de gran relevancia es que son las entradas difusas las que hacen el mayor aporte tanto de nitrógeno y fósforo a los ecosistemas acuáticos y dichos aportes no son considerados en la normativa vigente.

Bajo este enfoque, cabe mencionar que la dinámica de los dos elementos es compleja en los ecosistemas acuáticos, además de difícil de evaluar por las distintas reacciones en que se ven envueltos, principalmente el nitrógeno. Otro aspecto de importancia en cuanto a la comparación con las normativas de Canadá, Estados Unidos, Gran Bretaña y los países pertenecientes a la Unión Europea es que ellos, además de los análisis físico-químicos que realizan a los cuerpos de agua

conjuntamente evalúan índices de integridad biótica (entre otros estudios) lo que da una mayor aproximación de la salud de los ecosistemas acuáticos.

Al considerar el panorama de la mayoría de los cuerpos de agua de México, es necesario que se replanteen los parámetros y sus valores de tolerancia, principalmente para los derivados del ciclo del nitrógeno. Sin embargo, es importante conocer más ampliamente los niveles de tolerancia de diversas especies nativas y endémicas (como los peces goodeídos) ya que con esta información se podrían establecer límites que protejan a la fauna silvestre de los diferentes cuerpos de agua.

En particular dentro del grupo de los goodeidos existen especies tolerantes, caso claro es *G. atripinnis*, que mostró una gran capacidad de adecuación en las pruebas realizadas y que sobrevive a pesar de las alteraciones ambientales. Por otro lado, también existen especies sensibles a la degradación ambiental como *S. multipunctata*, la cual ve comprometida su supervivencia bajo condiciones adversas.

Los resultados obtenidos en la presente investigación no nos permiten establecer un intervalo preliminar de tolerancia para el grupo de los goodeídos. Sin embargo, la información generada es de gran utilidad ya que hasta ahora no se contaba con datos respecto a la distinta sensibilidad de las especies del grupo. No obstante, el manejo en laboratorio nos muestra que dentro de los goodeídos existen especies aún más sensibles que *S. multipunctata*, por lo que es importante ampliar la información con estudios similares en otras especies de goodeídos. En tanto se amplía la información referente a los niveles de tolerancia de más especies del grupo, los valores obtenidos como límites para *S. multipunctata* para ambos contaminantes puede ser utilizados como valores de referencia de la calidad de agua para especies sensibles de goodeidos.

Por otro lado, los goodeidos son peces vivíparos que producen reducidos números de crías (entre 15 a 30 crías), lo cual es una limitante para la realización de los estudios de toxicidad. Asimismo, para algunas especies una vez nacidas las crías es difícil su manipulación ya que existe el riesgo latente de mortalidad por estrés y/o manejo. Sin embargo, son estas especies sensibles las que enfrentan estatus de conservación de mayor riesgo.

Tabla 5.- Comparación de normas y sus respectivos parámetros considerados para la protección de la vida acuática.

Norma por País	Parámetro	Conc. (mg/L)			
Australia y Nueva Zelanda	N. inorgánico (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NH <sub>3</sub> )	≤ 0.10			
Canadá	NH <sub>3</sub>	0.019			
	NO <sub>3</sub>	<b>Corta exposición</b> 13 – 3	<b>Larga exposición</b> 550-125		
Estados Unidos		<b>A. salmonícolas</b>	<b>A. ciprinícolas</b>		
	NH <sub>4</sub>	</ = 0.04 <sup>(1)</sup> </ = 1 <sup>(2)</sup>	</ = 0.2 <sup>(1)</sup> </ = 1 <sup>(2)</sup>		
	NH <sub>3</sub>	< = 0.005 <sup>(1)</sup> </ = 0.025 <sup>(2)</sup>	</ = 0.005 <sup>(1)</sup> </ = 0.025 <sup>(2)</sup>		
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	</ = 0.01	</ = 0.03		
Gran Bretaña	NH <sub>4</sub>	1	>1		
	NH <sub>3</sub>	</ = 0.025	</ = 0.025		
México	N. total	<b>Promedio diario</b> 25	<b>Promedio mensual</b> 15		
República de Chile	Parámetro	Clase de excepción	Clase 1	Clase 2	Clase 3
	NH <sub>3</sub> (mg/l)	< = 0.5	1	1.5	2.5
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	< = 0.05	>= 0.06	>= 0.06	>= 0.06
Unión Europea		<b>A. salmonícolas</b>	<b>A. ciprinícolas</b>		
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	≤ 0.001	≤ 0.03		
	NH <sub>3</sub>	≤ 0.025	≤ 0.025		
	NH <sub>4</sub>	≤ 1 <sup>(4)</sup>	≤ 1 <sup>(4)</sup>		

(1): valor guía

(2): valor imperativo

Clase de excepción: adecuada para la conservación de las comunidades acuáticas

Clase 1: muy buena calidad para la protección y conservación de las comunidades acuáticas

Clase 2: agua adecuada para el desarrollo de la acuicultura, de la pesca deportiva y recreativa

Clase 3: regular calidad: para bebida de animales y para riego restringido

Tabla 6.- Valores considerados con respecto al fósforo por país.

Norma por país	Parámetro	Conc. (mg/L)
Australia		
Nueva Zelanda	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.015 – 0.030
México	Fósforo total	10 (PM), 15 (PD)

Tabla 7.- Niveles tróficos y sus respectivos valores considerados para Canadá y La Unión Europea.

<b>Estatus trófico</b>	<b>Conc. (mg/L)</b>
Ultra oligotrófico	<0.004
Oligotrófico	0.004 – 0.010
Mesotrófico	0.010 – 0.020
Meso eutrófico	0.020 – 0.035
Eutrófico	0.035 – 0.100
Hipertrófico	> 0.100

## 8.- Conclusiones

- ❖ Las  $CL_{50}$  obtenidas para *S. multipunctata* fueron 0.064 mg/L-24 h  $NO_2^-$ , 13.18 mg/L 96 h  $PO_4^{3-}$ . Para *G. atripinnis* 2.03 mg/L-96 h  $NO_2^-$  y 3529.9 mg/L-96 h  $PO_4^{3-}$  respectivamente.
  
- ❖ Las concentraciones sub letales de nitritos y fosfatos causaron mortalidad, alteraciones histológicas y conductuales en las crías de la especie sensible (*Skiffia multipunctata*).
  
- ❖ Las concentraciones utilizadas en la presente investigación y que causaron efectos (mortalidad, alteraciones histológicas y conductuales) en las especies bajo estudio se encuentran por debajo de las propuestas por la Norma Oficial Mexicana-001-ECOL-1996 para garantizar la protección de fauna silvestre.

## 9.- Recomendaciones

- ❖ Es prioritario disminuir los aportes de nitritos y fosfatos a los cuerpos de agua.
- ❖ Para garantizar la conservación y permanencia de especies endémicas y nativas (como los peces goodeídos) se recomienda usar la información generada para *S. multipunctata*.
- ❖ Considerar límites de tolerancia para otras especies químicas en la Norma Oficial Mexicana 001- ECOL-1996 e idealmente índices de integridad biótica.
- ❖ Adecuar los límites de tolerancia establecidas en la Norma Oficial Mexicana 001- ECOL-1996 para el nitrógeno considerando especies endémicas y nativas, dando prioridad a las especies sensibles.

## 10.- BIBLIOGRAFÍA

- Aggergaard, S y Jensen, F. 2001. Cardiovascular changes and physiological response during nitrite exposure in rainbow trout. *Journal of Fish Biology*. 59: 13-27
- Arellano-Aguilar, O y Macías, G. C. 2008. Exposure to pesticides impairs the expression of fish ornaments reducing the availability of attractive males. *The Royal Society*. 275:1343-1350.
- Arellano-Aguilar, O y Macias, C. 2009. Effects of methyl parathion exposure on development and reproduction in the viviparous fish *Girardinichthys multiradiatus*. *Environmental Toxicology*. 24: 178-186.
- Bielinska, I. 1987. Dielectric haematological and biochemical studies of detergent toxicity in fish blood. *Physics in Medicine and Biology*. 32 (5).
- Bindon, S., Gilmour, K., Fenwick, J y Perry, S. 1994. The effects of branchial chloride cell proliferation on respiratory function in the rainbow trout *Oncorhynchus mikiss*. *Journal of experimental Biology*. 197: 47-63.
- Brauner, A., Vol, A y Randall, D. 1993. The effect of graded methaemoglobin levels on the swimming performance of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytsch*). *J. ex, Biol*. 185: 121-135.
- Camargo, J.A., Alonso, A y Salamanca, A. 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*. 58:1255-1267.
- Carpenter, S. R., Caraco, N. F., Correll, D. L., Howarth, R. W., Sharpley, A. N y Smith, V. H. 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications*. 8: 558-568.
- Chezian, A., Kabilan, N y Senthamitselvan, D. 2010. Impact of chemical factory effluent on the structural changes in gills of estuarine fish, *Mugilcephalus*. *World Applied Sciences Journal*. 8: 922-927.
- Clotfelter, E y Rodríguez, A. 2005. Behavioral changes in fish exposed to phytoestrogens. *Environmental Pollution*. 144, 833 – 839.
- Cuevas, A. R., Cortés, M.R., Israde, A. I., Carreón, A. Y. Martínez, T. M., Cabrera, A. y Medina, O. L.E. 2011. Producto 1. Informe sobre la calidad del agua, sedimentos y suelos en el meandro de La Piedad, Michoacán. En: Rueda-Jasso, R.A. (Coordinador general del proyecto) Informe Técnico Final del proyecto FOMIX 73881 "Saneamiento del cauce natural (meandro) del río Lerma e integración del mismo a la dinámica urbana de La Piedad Michoacán. 28 de febrero 2011.
- De la Lanza, E. 1995. Lagos y presas de México. Centro de Ecología y Desarrollo. México. 320 pp.
- De la Vega, S. Y. 2003. Situación de los peces dulceacuícolas en México. *Ciencias*. 30-40 pp.
- De la Vega, S. Y., Martínez, L y Macías, C. 1997. Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramirez dam in Mexico. *Ecotoxicology and environmental safety*. 38: 53-62.
- De la Vega-Salazar, M. 2005. Estado de conservación de los peces de la familia Goodeidae (Cyprinodontiformes) en la mesa central de México. *Biología Tropical*. 54 (1):163-177.



- De los Santos, A. 2010. Efecto tóxico letal y subletal de los fosfatos en crías de *Skiffia multipunctata* (Pellegrin 1901). Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 56 pp.
- Domínguez-Domínguez, O., Mercado-Silva, N., Lyons, J. y Grier, H. J. 2005. The viviparous fishes. En: Uribe, M.C y H. J. Grier (Eds). Viviparous fishes. New Life. México. 525-569 pp.
- Domínguez, D. O y Pérez, P. G. 2007. Los goodeidos, peces endémicos del centro de México. CONABIO. Biodiversitas. 75, 12-15.
- Domínguez, D. O. 2008. Filogeografía de *Zoogoneticus quitzeoensis*, *Xenotoca variata* y *Allophorus robustos* (Cyprinodontiformes: Goodeidae) en el Centro de México: implicaciones taxonómicas y de conservación. Tesis de doctorado. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 241 pp.
- Edwards. M. T., Miller, D y Guillette, J. 2006. Water Quality Influences Reproduction in Female Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from Eight Florida Springs. Environmental Health Perspectives. 114: 69-75.
- Escutia, M. 2005. Análisis de la calidad del agua en la laguna de Zacapu, Michoacán, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 47 pp.
- Espinosa-Pérez. H. 1993. Riqueza y diversidad de peces. Ciencias. México. Número especial 7, 77-84.
- Evans, D. 1987. The Fish Gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*. 71: 47-58
- Evans, D., Piermarini, P y Choe, K. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*. 1: 97-177.
- Evans, J., Park, D., Brill, C., y Klesius, H. 2006. Un-ionized Ammonia Exposure in Nile Tilapia: Toxicity, Stress Response, and Susceptibility to *Streptococcus agalactiae*. Publications from USDA-ARS / UNL Faculty. 531.  
<http://digitalcommons.unl.edu/usdaarsfacpub/531>
- Favari, L., López, E., Martínez-Tabche, L y Díaz-Pardo, E. 2002. Effects of insecticides on plankton and fish of Ignacio Ramirez Reservoir (Mexico): a biochemical and biomagnifications study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 51: 177-186
- Ferrati, L., Eissa, B., Ossana, N y Salibián, A. 2010. Effects of subletal waterborne cadmium on gills in three teleostean species: scanning electron microscope study. *Int. J. Environment and Health*. 10: 1-17.
- Foskett, J., Howard, A., Ferry, E y Conner, M. 1983. Chloride cells and the hormonal control of teleost fish osmoregulation. *Journal experimental biology*. 106: 255-281.
- Fulton, M y Key, M. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20: 37-45.

- Galaviz-Villa, I., Landeros-Sánchez, C., Castañeda-Chavez, M., Martínez-Dávila, J., Pérez-Vázquez, A., Nikolskii-Gavrilov, I., Lango-Reynoso, F. 2010. Agricultural contamination of subterranean water with nitrates and nitrites: an environmental and public health problema. *Journal of agricultural science*. 2: 17-30.
- Gómez, F. 2003. Evaluación de la calidad del agua con base en los parámetros fisicoquímicos, productividad primaria y análisis bacteriológico de la presa La Mintzita, Municipio de Morelia, Michoacán, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 57 pp.
- Heath, A. 1995. *Water pollution and fish physiology*. Second edition. Lewis Publishers. 359 pp.
- Hellou, J. 2011. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research*. 18, 1 – 11.
- Hernández M. R. 2011. Fitoplancton de los Lagos Cráter de Michoacán. Tesis de Maestría. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 235 pp.
- Herrera, R. 2007. Evaluación de metales pesados y arsénico en agua y sedimentos del lago de Cuitzeo. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 105 pp.
- Huacuz, J. 2007. Caracterización fisicoquímica y calidad del agua en el vaso este del lago de Cuitzeo, Michoacán. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 91 pp.
- Huidobro, C. L. 2000. Peces. En: De la Lanza, E., Hernández, P y Carbajal, P (Eds). *Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores)*. Plaza y Valdes. México. 195-260 pp.
- In-Seok, P., Jinhwan, L., Jun-Wook, H., Young-Chae, S., Hae, C. H y Choong, H. N. 2007. Acute toxicity and sublethaleffects of nitrite on selected hematological parameters and tissues in dark-banded rockfish, *Sebastesinermis*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 38 (2), 188-199.
- Jelks, L.H., Walsh, S.J., Burkhead, N.M., Contreras-Balderas, S., Díaz-Pardo, E., Hendrickson, D.A., Lyons, J., Mandrak, N.E., McCormick, F., Nelson, J., Platania, S.P., Porter, B.A., Renuad, C.B., Schnotter-Soto, J.J., Taylor, E.B. y M.L. Warren Jr. 2008. Conservation status of imperiled North America freshwater and diadromus fishes. *Fisheries* 33(8), 373-407.
- Jensen, F. 1990. Nitrite And Red Cell Function In Carp: Control Factors For Nitrite Entry, Membrane Potassium Ion Permeation, Oxygen Affinity And Methaemoglobin Formation. *The Journal of Experimental Biology*. 152: 149-166.
- Jensen, F. 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Elsevier*. 135: 9-24.
- Kane, A. S, Salierno, J. D y Brewer, S. K. 2005. Fish models in behavioral toxicology: Automated techniques, updates and perspectives. In: Ostrander, GK, editor. *Methods in Aquatic Toxicology (Chapter 32)*.2, 559 – 590.
- Kramer, D. 1987. Dissolved oxygen and fish behavior. *Environmental Biology of Fishes*. 18: 81-92.

- Kroupova, H., Machova, J., Svobodova, Z., Piacknova, V y Smutna, M. 2006. The ability of recovery in common carp after nitrite poisoning. *VeterinariMedicina*. 51 (8):423-431.
- Kroupova, K., Machova, J y Svobodova, Z. 2005. Nitrite influence on fish: a review. *Veterinary Medical*. 50: 461-471.
- Lassaletta, C. L. 2004. Agricultura intensiva, alteración de ciclos biogeoquímicos y cambio global. II Jornadas Técnicas Ambientales. Madrid, España. 11pp.
- Lewis, W y Morris, D. 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. *Transactions of American Fisheries Society*. 183-195.
- López, H., Espinoza, M., Carranza, J. 2007. Análisis multimétrico para evaluar contaminación en el río Lerma y lago de Chapala, México. *Hidrobiológica*. 17–30 pp.
- López-López. E y Paulo-Maya. J. 2001. Changes in the fish assemblages in the upper Rio Ameca, Mexico. *Journal of Freshwater Ecology*. 16.
- Nelson, J.S. 2006. *Fishes of the World*. 4a edición. J. Wiley & Sons, Inc. New York. 539 pp.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001 Protección Ambiental- Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestres- Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio- Lista de Especies en Riesgo.
- Ortiz-Ordoñez, E., Uría-Galicia, E., Ruiz-Picos, R., Sánchez, A., Hernández, Y., Sedeño-Díaz, J y López, E. 2011. Effect of Yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and Hstological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 61: 443-452.
- Pérez, A. 2008. Evaluación de la calidad del agua de la presa Umequaro, Municipio de Morelia, Michoacán. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 62 pp.
- Perry, S. 1998. Relationships between branchial chloride cells and gas transfer in freshwater fish. *Comparative biochemistry and physiology. Part A: Molecular & Integrative physiology*. 119: 9-16.
- Quy, D., Llona, S y Matkovies, B. 1997. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 77: 83-88.
- Rabalais. N. 2002. Nitrogen in aquatic ecosystems. *Ambio*. 31: 102-112.
- Ramírez, D. W., Rondón, B. I., Vidal, B. H y Eslava, M. P. 2009. Toxicidad aguda y lesiones histopatológicas en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) expuestas a la mezcla del herbicida Roundup más surfactante Cosmoflux 411. *Red de revistas científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. 14 (1) 1563-1575.
- Rueda-Jasso, R. A., Perez-Munguia, R. y M.Martínez Trujillo. 2011. Producto 3. Informe del análisis biológico de las poblaciones presentes y manejo ecológico en el meandro. En: Rueda-Jasso, R.A. (Coordinador general del proyecto) Informe Técnico Final del proyecto FOMIX 73881 "Saneamiento del cauce natural (meandro) del río Lerma e integración del mismo a la dinámica urbana de La Piedad Michoacán. 28 de febrero 2011.

- Rueda-Jasso, R.A., Ayala-Bailón, J.M. 2007. Efecto del fotoperiodo en el crecimiento del pez endémico mexicano *Xenotoca eiseni*. Memorias en extenso del Congreso VI Congreso Internacional XII Nacional de Ciencias Ambientales, Chihuahua, Chih. Mex. 100-103.
- Schlesinger. W. 2008. On the fate of anthropogenic nitrogen. Cary Institute of Ecosystem Studies. PNAS. 106: 203-208.
- Schreck, C. B. 2010. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology* 165: 549–556.
- Schreck, C. B., Contreras-Sanchez, W y itzpatrick, M. 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture* 197: 3-24.
- Scott, G. y Sloman, K. 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*. 68, 369 – 392.
- Solórzano, S. E. 1998. Evaluación de la calidad del agua en el estado de Michoacán, periodo 1986-1995. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 140 pp.
- Stormer. J., Jensen, F y Rankin, J. 1996. Uptake of nitrite, nitrate, and bromide in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): effects on ionic balance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*.53: 1943-1950.
- Svobodova, Z., Machova. J., Poleszczuk. G., Hoda. J., Hamaakova, J. y Kroupova, H. 2005. Nitrite Poisoning of Fish in Aquaculture Facilities with Water-recirculating Systems. *Acta Veterinaria Brno*. 74: 129-137.
- Tejera-Vera, R., López-López, E y Sedeño-Díaz, J. 2007. Biomarkers and bioindicators of the health condition of *Ameca splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameca River, Mexico. *Environmental International*. 33: 521-531.
- Val, A. L. 2000. Organic phosphates in the red blood cells of fish. *Comparative biochemistry and physiology*. 125: 417-435.
- Vega-López, A., Jiménez-Orozco, F., Jiménez-Zamudio, L., García-Latorre, E y Domínguez-López, M. 2009. Prooxidant and antioxidant sex-linked response and its relationship to mixed oxidase function enzymes in liver of *Ameca splendens*, an endangered goodeid fish exposed to PCBs. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 91.
- Villalva, V. J. 2009. Efecto toxico letal 50 (LC<sub>50</sub>) y subletal de los nitritos en crías de *Skiffia multipunctata* (Pisces: Goodeidae). Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 48 pp.
- Vitousek. P., Aber. J., Howarth. W., Likens. G., Matson. P., Schindler. D., Schlesinger. W y Tilman. D. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications*. 7: 737-750.
- Voslárová, E., Disteková, A., Svobodova, Z y Bedanova, I. 2008. Nitrite toxicity to *Danio rerio*: effects subchronic exposure on fish growth. *Acta Veterinaria Brno*. 77: 455-460.

- Welker, T. L., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M y Klesius, P. H. 2011. Susceptibility of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed with dietary sodium chloride to nitrite toxicity. *Aquaculture Nutrition*. 17 (4) e892-e901.
- Wuertz, S., Schulze, S. E., Eberhardt, U., Schulz, C y Schroeder, J.P. 2013. Acute and chronic nitrite toxicity in juvenile pike-perch (*Sander lucioperca*) and its compensation by chloride, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*.
- Yusoff, F. M., Law, A. T., Goh, Y. J. y Subasinghe, R. 1998. Effects of nitrite and pH on a tropical fish fry, *Puntius gonionotus* (Bleeker). *Pertanika Journal of tropical agricultural science*. 21: 29-36.
- Zeni, C. y Stagni, C. A. 1992. Morphological and ultrastructural changes induced by sublethal concentrations of an anionic detergent on *Ictalurus* species barbells taste buds. *Aquatic toxicology* 41-52.
- Zeni, C., Bovolenta, M. y A. Stagni. 2001. Occurrence of echinocytosis in circulating RBC of black bullhead, *Ictalurus melas* (Rafinesque), following exposure to an anionic detergent at sublethal concentrations. *Aquatic Toxicology* 57, 217 – 224.

#### 10. 1. - Referencias electrónicas

FWR. 2010. Sources of pollution and diffuse pollution. Foundation for water research (FWR). Disponible en: [http://www.euwfd.com/html/sources\\_of\\_pollution\\_diffuse\\_pollution\\_html](http://www.euwfd.com/html/sources_of_pollution_diffuse_pollution_html). Julio 2010.

OCDE. 2008. OCDE guidelines for the testing of chemicals. En: [www.oecd.org/.../0,3343,en\\_2649\\_34377\\_1916054\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/.../0,3343,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html)

#### 10. 2. - Normas de calidad de agua

Canadian Council of Ministers of the Environment. Canadian Environmental quality guidelines. Water quality guidelines for the protection of aquatic life.

[www.ccme.ca/index.html](http://www.ccme.ca/index.html)

Diario oficial de la Unión Europea. Directiva 2006/44/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. Relativa a la calidad de las aguas continentales que requieren protección o mejora para ser aptas para la vida de los peces.

Environmental Agency. Environmental Quality standards. Standards aim to: protect wildlife and nature.

[www.environment-agency.gov.uk](http://www.environment-agency.gov.uk)

Gobierno de Chile. Comisión Nacional del Medio Ambiente. Guía Conama para el establecimiento de las normas secundarias de calidad ambiental para aguas continentales superficiales y marinas. Criterios nacionales específicos para el establecimiento de las normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales superficiales. 18 pp.

National water quality management strategy. Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine water quality. Australian and New Zealand Environment and conservation council. 678 pp.

Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

United States Environmental Protection Agency (EPA). Water quality standards: protecting human health and aquatic life.

[Water.epa.gov](http://Water.epa.gov)