



Universidad Michoacana de San Nicolás
de Hidalgo

Facultad de Biología

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

AREA TEMÁTICA EN ECOLOGÍA Y
CONSERVACIÓN

RESPUESTA MORFOLÓGICA E INMUNOLÓGICA DE
Ambystoma andersoni EN CUATRO CONDICIONES
AMBIENTALES DE LA LAGUNA DE ZACAPU, MICHOACÁN.

Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias presenta:

Jessica Gómez Rodríguez

Directora de Tesis: Dra. Yvonne Herrerías Diego



FACULTAD
DE
BIOLOGÍA

Abril, 2013

DECLARACIÓN

Los datos del presente proyecto fueron financiados por dos instancias; el proyecto “Conservación y Manejo *Ex situ* de dos especies del género *Ambystoma* endémicas para el estado de Michoacán, México” número DUNS 812356251 financiado por el programa de Vida Silvestre sin Fronteras – México, del Servicio de Pesca y Vida Silvestre de los Estados Unidos de América; y el proyecto “Uso de hábitat e historias de vida de dos especies endémicas (*Ambystoma andersoni*: Amphibia y *Anas diazi*: Aves) en la laguna de Zacapu, Michoacán.” financiado por la Coordinación de la Investigación Científica, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

AGRADECIMIENTOS

Mis pilares, mis amores, mis motores, mis cuatro padres; gracias mamá por enseñarme a concluir cada proceso que comienzo en mi vida, gracias por todos tus días con sus noches de estar en casa educándome dejándote guiar por Él, gracias papá por amarme con libertad y enseñarme a elegir, por todos los lujos de amor como tiempo, abrazos y besos que me das. Gracias Lude y Dany por estar siempre aquí, por escucharme, por apoyarme, por impulsarme y por amarme tanto.

A ustedes Mayte y Hesajim, que en esos momentos de melancolía y estrés abrumador, me ayudaban a salir del transe, suspirando y sonriendo para volver a la marcha.

¡Cuántas aventuras Licho! Cuántas caminatas y ricas comidas hemos tenido la oportunidad de degustar en la travesía, con palabras no alcanzo a agradecer toda tu ayuda en este trayecto.

Cada uno de ustedes, desde el que llega tarde y se va temprano, a quien se ofusca rápidamente, el que habla poco y se escapa a comer sin los demás, a quienes me comparten no sólo de su conocimiento sino de su comida, a quienes me preguntan, a quienes me escuchan y a cada cual que forma parte de este gran grupo ¡Gracias laboratorio de Fauna (para mi, Vida) silvestre!.

A ti compañero de horas incontables de trabajo, de días largos y noches cortas, de horas de redacción que parecían no tener fin, de momentos difíciles, de gusto, de enojo y de victoria, tu que has compartido conmigo estos años de formación contemplando todo desde un hermoso enfoque, gracias César.

A todos ustedes que hacen posible este logro, a quienes me rescataron de la incertidumbre de concluir esta tesis, a quienes me dedicaron tiempo de su vida y me dieron una palmada en la espalda para impulsarme, a quienes me dieron una llamada de atención, a quienes me decían ¡Tu puedes, persevera! Inclusive a quienes me comentaban ¡Eso no es para ti... ¿Cómo se te ocurre?! Que bueno que han estado en mi vida, por que todo es parte del proceso.

¡Mi más profundo agradecimiento, por formar parte de este proyecto!

ÍNDICE

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iv
INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes de la especie	7
Taxonomía y morfología de <i>Ambystoma andersoni</i>	8
OBJETIVOS	10
Objetivo general	10
Objetivos particulares.....	10
HIPÓTESIS	10
ÁREA DE ESTUDIO	11
Ubicación y descripción del área	11
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Diseño de Muestreo	13
Evaluación de parámetros físico-químicos	16
Asimetría fluctuante.....	17
Índice de condición corporal.....	17
Parámetros hematológicos.....	18
Análisis de los datos	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
a) PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DETERMINADOS	19
b) ASIMETRÍA FLUCTUANTE, ÍNDICE DE CONDICIÓN CORPORAL, RELACIÓN HETERÓFILO/LINFOCITOS Y PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS	29
CONCLUSIONES	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
Apéndice I. Parámetros físico-químicos determinados	62
Apéndice II. Correlaciones no significativas	68

RESUMEN

El ambiente ha sido modificado, y dentro de las modificaciones efectuadas se han producido la contaminación de tipo industrial, química y doméstica por señalar algunas, ocasionado por el aumento de la población humana. Esta presión antropogénica pueden causar mortalidad o efectos que sin llegar a ser letales, afectan la forma en como responden morfológica e inmunológicamente los animales silvestres, lo que puede comprometer a las poblaciones, aumentando su declive, sobre todo aquellas especies de distribución restringida. *Ambystoma andersoni* es una especie endémica y en estatus de sujeta a protección especial y endémica a la laguna de Zacapu, la cual se encuentra inmersa en la ciudad con mismo nombre. El objetivo de este trabajo es establecer la relación entre la respuesta morfológica e inmunológica de *Ambystoma andersoni* en cuatro condiciones ambientales de la Laguna de Zacapu, Michoacán. Mediante muestreos mensuales, de mayo de 2011 a abril de 2012 se colectaron 159 individuos adultos, se determinaron asimetría fluctuante (AF) e índice de condición corporal (IC) mediante análisis de medidas biométricas (peso, longitud hocico-cloaca, de cauda, de las patas anteriores, posteriores y branquias) como respuesta morfológica; se determinaron perfiles leucocitarios como respuesta inmunológica; debido a que el éxito de conservación o recuperación de poblaciones silvestres de organismos acuáticos depende de que sus hábitats presenten la calidad necesaria, como concentraciones altas de oxígeno, pH neutro, bajo índice de contaminantes, para desarrollar una saludable comunidad biológica, se determinaron algunos parámetros ambientales como temperatura del agua y del ambiente, oxígeno disuelto, pH, nitritos, cloro libre y transparencia. La asimetría fue más direccional que AF, no se presentaron diferencias por sitios ($F=2.10$, g.l. 3, $p=0.1018$). El IC fue mayor en hembras que en machos ($F=5.8568$, g.l.1, $p=0.0168$) asociado a la formación de huevos en urodelos, sin diferencias por sitios ($F=1.2134$, gl.3, $p=0.3071$). El perfil leucocitario fue el único que mostró diferencias por sitios, se determinó la relación de Heterófilos/Linfocitos como respuesta al estrés, siendo mayor en el sitio 2 ($F=5.4646$, g.l. 3, $p=0.0014$) asociado con ser el sitio con mayores concentraciones de cloro libre como contaminante y bajos valores de pH, ambas correlacionadas negativamente ($F=20.9789$, g.l. 1, $p<.0001$). Ni los nitritos, ni la transparencia tienen relación con el peso de los individuos colectados ($F=0.0642$, g.l. 1, $p=0.8003$ y $F=0.327$, g.l. 1, $p=0.8567$ respectivamente). Los parámetros hematológicos determinados en los individuos, respondieron de forma particular a las variaciones espaciales y temporales de las cuatro condiciones ambientales.

Palabras clave: *Ambystoma andersoni*, Laguna de Zacapu, Índice de condición corporal, Parámetros hematológicos, Índice de heterófilos/linfocitos.

ABSTRACT

Environment has been modified, and inside there have been changes made pollution of industrial, household chemical and by pointing out some, caused by increased human population. These pollutants resulting from anthropogenic pressure can cause lethal or non-lethal effects on wildlife, potentially contributing to the decline of its populations, especially on those with restricted distribution. *Ambystoma andersoni* is a species with “special protection” status and endemic to Zacapu Lake, which is immersed within the city of the same name. The aim of this study was to establish the relation between the morphological and immunological response of *Ambystoma andersoni* in four environmental conditions at Zacapu Lake. Monthly samples from May 2011 to April 2012, resulted in 159 individuals collected; biometric measurements were taken (weight, length of tail, front legs, back legs and gills) to determine fluctuating asymmetry (FA) and Body Condition Index (BCI). A blood sample was taken for leukocyte profiling like a immunological response, The successful of conservation to wild populations in aquatic individuals depends that their habits have the necessary quality, like high concentration of dissolved oxygen, neutral pH, low index of contaminants, to develop a health biology community, some environmental parameters were measured (environment temperature, water temperature, dissolved oxygen, pH, nitrite, free chlorine and transperence). The asymmetry was more directional than FA, there were no significant differences by site ($F = 2.10$, $df 3$, $p = 0.1018$). The BCI was higher in females than in males ($F = 5.8568$, $df 1$, $p=0.0168$) associated with vitelogenesis in urodeles, with no differences between sites ($F = 1.2134$, $gl.3$, $p=0.3071$). The leukocyte profile exhibited differences between sites. The Heterophil/Lymphocyte did response to stress, being higher at site 2 ($F = 5.4646$, $df 3$, $p=0.0014$) associated with high concentrations of free chlorine and low concentrations of pH, that are negatively correlated ($F = 20.9789$, $df 1$, $p < 0.0001$). Neither nitrites -one of the worst pollutants in aquatic media-, neither visibility was correlated to the weight of individuals collected ($F = 0.0642$, $df 1$, $p = 0.8003$ and $F = 0.327$, $df 1$, $p = 0.8567$ respectively). The hematological parameters determinated, response in particular to spatially and temporally variations, in the four environmental conditions.

Key words: *Ambystoma andersoni*, Zacapu Lake, Body condition Index, Haematological parameters, Index heterophil / lymphocyte.

INTRODUCCIÓN

Los lagos, lagunas y ríos son sistemas importantes para el humano, por el recurso hídrico y por la diversidad biológica que presentan (Moncayo, 1996). Han sido sobreexplotados, contaminados y en ocasiones reducida su capacidad de almacenamiento, diversidad biológica y su función ecosistémica (González *et al.*, 1993). Existen diferentes iniciativas para la protección de cuerpos de agua, tanto internacionales, como la Convención sobre los Humedales de Importancia Internacional llamados sitios (RAMSAR), así como nacionales por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) las llamadas Regiones Hidrológicas Prioritarias (Martínez-Aquino *et al.*, 2007).

Hasta finales del 2012 en el estado de Michoacán, existen nueve humedales registrados como sitios RAMSAR, cuatro costeros y cinco en aguas interiores. Siete regiones hidrológicas prioritarias como áreas naturales protegidas (CONABIO). Sólo tres se encuentran incluidos en ambos convenios mencionados y la laguna de Zacapu es uno de ellos. La laguna de Zacapu es un sitio interesante para la investigación debido a que es una zona con gran importancia económica y ecológica tanto a nivel nacional como internacional (Arriaga *et al.*, 1998; Martínez-Aquino *et al.*, 2007), incluye especies endémicas y en categorías de riesgo (Arriaga *et al.*, 1998; Martínez-Aquino *et al.*, 2007) como *Ambystoma andersoni* Krebs y Brandon, 1984 sujeta a protección especial (PR) de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010, *Allotoca zacapuensis* (Meyer *et al.*, 2001) y *Notropis grandis* (Dominguez-Dominguez *et al.*, 2009). Este humedal fue una ciénega de gran extensión, de la cual 12,261.53 hectáreas fueron drenadas para la agricultura a finales del siglo XIX (Cayetano-Reyes, 1982); su extensión se ha visto reducida quedando embebido dentro de la mancha urbana de la ciudad de Zacapu, donde a partir de la desecación de la ciénega, la Laguna de Zacapu es el cuerpo de agua más importante de la región (Moncayo, 1996).

Los humedales tienen una relevancia funcional y a escala de paisaje, son ecosistemas complejos y dinámicos donde las interacciones entre suelo, agua y atmósfera son significativas (Mooney *et al.*, 1995). Estas características principales de interacción dificultan la valoración de los impactos así como el estado ecológico, siendo necesario el desarrollo de métodos de evaluación (Burton *et al.*, 1999), y en este sentido existen algunos parámetros que están

asociados a cuestiones como distribución y disponibilidad de recursos o condiciones como la temperatura, que puede afectar distribución de poblaciones biológicas que los habita (Diller y Wallace, 1996).

Los parámetros físico-químicos pueden variar de acuerdo a la naturaleza del cuerpo de agua, lo cual permite determinar si es posible el uso del recurso hídrico para uso humano. Además estos parámetros pueden ser modificados dependiendo de las condiciones climáticas y geológicas de la región (Boyacioglu, 2007). Por otro lado, la acción antropogénica es otro de los factores que modifican las condiciones en la que se encuentra el cuerpo de agua y por consiguiente las comunidades biológicas que los habitan, razón por la cual los parámetros físico-químicos permiten analizar como se encuentra el cuerpo de agua, pero exigen una frecuencia de muestreo apropiada pues indican una condición puntual del agua o también llamada una “foto fija” del ecosistema (Pérez-Castillo y Rodríguez, 2008). A su vez, los parámetros físico-químicos han sido utilizados como indicadores de la calidad de los sistemas acuáticos, debido a que muestran el estado químico respecto a la contaminación de una serie de sustancias específicas, las cuales son recogidas en la normativa de la calidad ambiental NOM-127-SSA1-1994.

Existen algunos parámetros físico-químicos necesarios para la sobrevivencia de anfibios como el oxígeno disuelto (O_2) que es necesario para la respiración y otros procesos aeróbicos, siendo los valores aceptables aquellos mayores a 80% de saturación (Odum *et al.*, 1984; Whitaker, 2001; Odum y Zippel, 2008). El Amoniaco/amonio es muy tóxico, puede ser producto de desecho metabólico, que ya en el cuerpo de agua dependerá del pH y temperatura entre otros factores para modificarse a otros compuestos nitrogenados, donde el nivel aceptable es menor que 0.2mg/L (Rouse *et al.*, 1999; Whitaker 2001). Los nitritos son altamente tóxicos, siendo un producto de la descomposición biológica del amoniaco/amonio, donde los valores aceptables son menores que 1.0mg/L aunque lo ideal es cero (Marco *et al.* 1999; Whitaker 2001). Valores superiores a 1.01mg/L de nitritos en el agua pueden ocasionar mortalidad en 15 días de exposición a este compuesto en larvas de *Ambystoma* (Marco, *et al.*, 1999); así como concentraciones superiores a 3.4 mg/L pueden interrumpir el proceso de eclosión en *Rana sylvatica* (Griffis-Kyle, 2005). A los nitratos se les considera ligeramente tóxicos, el cual es aceptable en cantidades menores que 50.0 mg/L (Westin 1974; Whitaker, 2001). El pH puede causar problemas metabólicos si no esta dentro del rango aceptable para

las especies (por lo general cerca de neutral), debido a que altera el intercambio iónico; pH por debajo de 6 y por encima de 8 son potencialmente un problema (Waner *et al.*, 1991; Whitaker, 2001). El cloro libre (Cl_2) es muy tóxico debido a que puede dañar el tejido del sistema respiratorio; el nivel aceptable para anfibios es cero, no obstante algunas formas adultas parecen ser capaces de tolerar el agua clorada en concentraciones de 0.0034mg/L (*Ceratophrys ornata*, *Rana catesbeiana*, *Ambystoma texanum*, *Ambystoma tigrinum*, *Litoria caerulea*, *Ichthyophis kohtaoensis*; Arthur y Eaton, 1971; Culley, 1992; Odum y Zippel, 2008). Los fosfatos (PO_4^{3-}) son tóxicos no sólo para anfibios sino para otras especies, debido a que interfieren con el metabolismo del calcio; se han especificado como 10mg de fosfatos por litro de agua como tóxicos (Odum y Zippel, 2008). En este estudio se determinó la concentración de oxígeno disuelto (O_2), cantidad de nitritos en el agua, el cloro libre (Cl_2), el pH, así como la temperatura del ambiente, temperatura del agua y la transparencia.

Los seres vivos responden a la perturbación antropogénica o contaminantes, por ejemplo modificando su distribución, abundancia, dispersión, éxito reproductivo, cambian de hábitos (p.e. dieta, Whiles *et al.*, 2004), pueden incrementar los niveles de competencia (intra e interspecífica), modificar su respuesta a enfermedades y parásitos aumentando su sensibilidad, entre otros. Estas modificaciones pueden ser utilizadas como estimadores de los atributos o estado de las especies o condiciones ambientales para conocer y documentar respuestas como las señaladas (Caro y O'Doherty, 1999). Cuando los individuos tienen que hacer frente a condiciones adversas en el hábitat se puede observar como se desencadena una serie de respuestas al estrés; algunas son morfológicas y otras son actividades fisiológicas las cuales pueden alterarse parcial o totalmente, de manera que los recursos energéticos se orientan a cubrir las demandas de otros órganos (García-Belenguer y Mormede, 1993).

Existen algunas herramientas que pueden auxiliar a conocer la respuesta de los animales ante el medio, como la asimetría fluctuante (AF), que permite realizar comparaciones cuantitativas sobre cuan preciso puede ser el desarrollo de individuos a través de medir sus caracteres bilaterales (Swaddle *et al.*, 1994; Palmer, 1994; Palmer, 2001). Autores como Kozlov, *et al.* (1996) y Leung (2000) han encontrado relaciones directas entre la AF y la degradación ambiental en diversas especies, debido a que existen factores ambientales que pueden mermar el desarrollo óptimo y simétrico de los organismos, como ser sometidos a

temperaturas variantes, la falta de recurso alimenticio que puede provocar estrés nutricional, factores químicos como contaminantes de tipo doméstico e industrial y alta presión de parásitos, entre otros factores adversos (McCoy y Harris, 2003). La asimetría fluctuante que se puede observar que en los individuos tiende a ser mayor cuando los agentes estresantes son más severos, como el caso de las poblaciones de *Ambystoma maculatum* estudiadas por Wright y Zamudio (2002), quienes señalan que aquellos organismos expuestos a frecuentes disturbios son más asimétricos que aquellos que forman parte de una población en sitios de reserva, tomando en cuenta el espacio y la temporalidad.

Otro parámetro que permite analizar las posibles formas en que los individuos hacen frente a las condiciones ambientales adversas es el Índice de Condición Corporal (IC) que es una relación entre el peso y la talla de los individuos, que permite determinar tanto información individual como de la población y posiblemente la capacidad reproductiva de los individuos, que posteriormente puede ayudar en políticas de conservación (Stevenson y Woods, 2006). La condición corporal de un animal se refiere a su estado energético. Un animal en buenas condiciones puede tener más reservas de energía que un animal en malas condiciones (Millar y Hickling, 1990; Shine *et al.* 2001; Doyle y Whiteman, 2008). Por ejemplo, los individuos con mayores reservas de energía pueden tener mejor resistencia al ayuno y una mayor supervivencia que los individuos con menores reservas energéticas (Schulte-Hostedde *et al.*, 2001; Schulte-Hostedde *et al.*, 2005).

Por otro lado Davis y Maerz (2009) observaron que la variación de los índices de estrés entre densidades no parece ser causada por la variación en la condición corporal en individuos de *Ambystoma maculatum*, ya que los individuos que sobrevivieron no variaron de forma significativa en la condición corporal pero si en cuanto a sus características hematológicas. Además de las variaciones morfológicas que puedan experimentar los individuos ocasionadas por el estrés, las variaciones fisiológicas y los mecanismos de respuesta inmunológicos son factores que permiten determinar de forma integral el estado de conservación de una especie y el estado de salud dentro del hábitat (Wright, 2001a; Tok *et al.*, 2009; Cabagna *et al.*, 2011). Por lo tanto el estudio de los componentes sanguíneos es útil para conocer el estado de salud de las poblaciones debido a que puede ser un parámetro indicativo de poblaciones provenientes de sitios contaminados (Cabagna *et al.*, 2005) y como medida del

efecto inmunomodulador de plaguicidas (Forson y Storfer 2006: citado en Cabagna *et al.*, 2011).

Determinar los parámetros hematológicos es un método sencillo y poco invasivo que permite observar mediante un perfil leucocitario (conteo de los tipos de células para obtener porcentajes), si los individuos experimentan cambios fisiológicos y patológicos, y en los casos de las poblaciones silvestres, estos cambios pueden estar relacionados con factores ambientales, y se puede aplicar un índice que relaciona los heterófilos con los linfocitos (H/L) como respuesta a estrés crónico en los individuos, debido a que ante estrés, los linfocitos migran de la sangre a los tejidos y simultáneamente son otros los tipos de células que aparecen en mayores cantidades al ser menos afectados por estrés, lo que se puede expresar como estrés al ser una respuesta a las condiciones ambientales en que habita (Davis *et al.*, 2008; Cabagna *et al.*, 2011), que se puede ver claramente en *Ambystoma maculatum* que llevan a cabo metamorfosis (Davis y Maerz, 2009). No obstante que el conocer el perfil leucocitario de especies silvestres permite determinar el estado de salud de los organismos, son escasos los estudios sobre leucocitos en anfibios (Wright 2001a y Cabagna *et al.*, 2011). Desde las primeras publicaciones relacionadas con la hematología de anfibios se describen las células sanguíneas blancas (leucocitos) basadas en sus características de coloración (Jerrett y Mays, 1973; Rouf 1969), sin embargo Wright (2001a) señala que debido a que cada especie tiene parámetros particulares, la cantidad y el grado de similitud morfológica en las células de sangre periférica entre las especies siguen siendo desconocido para muchas de ellas.

En el presente trabajo se determina la respuesta morfológica e inmunológica de *Ambystoma andersoni* como una especie endémica y en estatus de riesgo, a cuatro condiciones ambientales en la Laguna de Zacapu, mediante la estimación y análisis de la asimetría fluctuante (AF), el Índice de condición corporal (IC) y parámetros hematológicos de la población adulta, así como algunos parámetros físico-químicos que influyen en el desarrollo de los anfibios. Se busca una posible respuesta del estado de salud de esta especie ante las condiciones ambientales del hábitat, debido a que la endemidad para la Laguna de Zacapu, aumenta la susceptibilidad a la desaparición de la población como efecto a los factores de declive que afectan a los anfibios como la contaminación biológica, contaminación química e industrial de la laguna, la extracción del recurso hídrico para satisfacer las necesidades de la población humana en un desarrollo constante. Este cuerpo de agua se encuentra inmerso en

una zona urbana en donde se hace uso del recurso hídrico para la industria, a los alrededores se practica la agricultura, y se encuentra establecida una comunidad de hortelanos (Moncayo, 1996), lo que influye en la calidad del agua de la Laguna de Zacapu (Escutia-Lara, 2008; Martínez-García, 2009) donde habita *Ambystoma andersoni*.

Antecedentes de la especie

El género *Ambystoma* está incluido dentro del orden Caudata (Scopoli, 1777), que son anfibios conocidos comúnmente como salamandras. Existen 10 familias en este orden, la familia Ambystomatidae es una de ellas (Gray, 1850: en Huacuz, 2008), siendo *Ambystoma* el único género de esta familia, donde hasta 2006 se han registrado 30 especies y 10 subespecies (Flores y Canseco, 2004; SIIT, 2006), de las cuales 16 se localizan en México y 15 son endémicas.

Las especies dentro del género *Ambystoma* presentan características que las hacen sumamente vulnerables, al ser endémicas o incluso microendémicas. Su biología es única, encontrando especies metamórficas, especies facultativas y especies no metamórficas. Estudios recientes a la última década muestran que estos organismos siguen siendo de los mejores modelos de investigación en análisis embriológicos, hormonales y expresión génica entre otros (Monaghan, 2007, Page, 2008, Huggins, 2011).

Estudios realizados con el género *Ambystoma*, sobre todo con especies de Estados Unidos y Canadá, se han enfocado en evaluar su composición bioquímica, taxonomía y sistemática, fisiología, reproducción, alimentación, genética de poblaciones, declive y parasitología, sin embargo pocos son los estudios que traten acerca de su conservación (Huacuz, 2002). En México existen pocos estudios sobre estas especies y en particular sobre las cinco especies no metamórficas obligadas (Casas *et al.*, 2004). Los estudios realizados en las especies restringidas en lagos del Eje Neovolcánico y orilla sur del Altiplano Mexicano, se restringen a dos grupos de trabajo, el primero en el Estado de México, que evalúa historia de vida de las especies (Aguilar *et al.*, 2001), reproducción *ex situ* (Aguilar-Miguel *et al.*, 2009), notas del estado de sus poblaciones (Casas-Andreu *et al.*, 2003), análisis espacial y conservación (Aguilar-Miguel *et al.*, 2009) y el segundo en el estado de Michoacán, donde se han realizado programas de conservación y manejo (Huacuz, 2002), y es el único donde se han enfocado en evaluar aspectos relacionados a la biología y conservación del género *Ambystoma* en la entidad (Huacuz, 2001, 2003 y 2008).

Dentro de los trabajos realizados en las especies del género *Ambystoma* en Michoacán, Krebs y Brandon (1984) describen a *Ambystoma andersoni* como una especie distinta y aislada en la Laguna de Zacapu. Anderson en 1967 y Brandon y Altig en 1970. Estos autores señalan diferencias encontradas al comparar a *Ambystoma andersoni* con otras especies cercanas geográficamente. Brandon (1989) señala que solo se ha registrado a *Ambystoma andersoni* en arroyos que desembocan en la laguna de Zacapu, y autores como Huacuz (2001) mencionan datos acerca de su posibles factores de declive, Aguilar y Casas (2005) elaboran la ficha de la especie para el Proyecto de Norma Oficial Mexicana.

Taxonomía y morfología de *Ambystoma andersoni*.

Los organismos de este género presentan surcos costales conspicuos a los costados del cuerpo, ojos pequeños, presentan boca con dientes vomerianos y pulmones, habitan en lugares como humedales, ríos, arroyos, charcas, lagos y lagunas. Tienden a presentar cuerpos corpulentos con cabeza grande y ancha, el hocico chato y la cola aplanada lateralmente, sobre todo en forma acuática. No presentan párpados móviles; tienen cuatro dedos en las patas delanteras y cinco en las posteriores. Presentan coloraciones diversas, como marrón o pardo, negro o verde, manchados con amarillo, naranjas y rosados, existiendo también albinos (Tihen, 1969; Duellman & Trueb, 1994; Larson, 1991; Larson & Dimmick, 1993; en Huacuz, 2008).

Krebs & Brandon (1984), señalan que *Ambystoma andersoni* se encuentra dentro del grupo de *Ambystoma tigrinum*, con cola corta y branquias. Su patrón de coloración naranja oscuro con numerosos puntos negros sobre el cuerpo entero lo distingue de otras especies mexicanas de *Ambystoma*; en la condición de adultos la aleta dorsal se reduce, los adultos miden entre 100 - 140 mm de longitud hocico cloaca (LHC) y 162 - 235 mm de longitud total (LT), no presentan índices de dimorfismo sexual en longitud corporal o proporciones del cuerpo, más que el expresado en el abultamiento de la región de la cloaca (Fig. 1).

A diferencia de la mayoría de las especies de anuros y salamandras que requieren de metamorfosis para cambiar de un estado juvenil acuático a un estado adulto con madurez sexual en forma terrestre, *Ambystoma andersoni* es una especie que presenta paedogénesis, es

decir esta especie no lleva a cabo este proceso y mantienen su forma juvenil acuática a lo largo de toda la vida adulta alcanzando su madurez sexual y reproducción en forma larvaria (Jonsson y Jonsson, 2001). Los individuos de esta especie poseen una coloración naranja oscuro con puntos negros sobre todo el cuerpo (Krebs y Brandon, 1984, Huacuz, 2008).



Figura 1. Individuo macho de la especie *Ambystoma andersoni* colectado en la Laguna de Zacapu

Los individuos de *Ambystoma andersoni* exhiben cortejo y fertilización interna, son ovíparos colocando sus huevos en el agua, con actividad reproductiva durante 10 meses al año, con mayor actividad entre mayo y julio, siendo junio el mes donde se registraron los mayores picos reproductivos. Presentan 43 estadios de desarrollo hasta la eclosión con una duración de 105 días. En fase juvenil, pueden tardar más de dos años en alcanzar la madurez sexual (Huacuz, 2008). Los adultos de *Ambystoma andersoni* son predominantemente bentónicos, aunque pueden utilizar en su captura de alimento toda la columna de agua; consume también presas sedentarias como briozoarios y moluscos o presas abundantes como el anfípodo *Hyallela azteca* y el camarón *Cambarellus montezumae*; éste último es el componente más importante en su dieta (Huacuz, 2008). A diferencia de otras especies del género que se comportan como especialistas (p.ej. *Ambystoma dumerilii*), exhiben una mayor amplitud de nicho alimentario (Huacuz, 2008), lo que les permite tener una mayor y más favorable respuesta a las modificaciones ambientales como la disponibilidad de recursos alimentarios del medio donde viven (Whiles *et al.*, 2004).

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer la relación entre la respuesta morfológica e inmunológica de *Ambystoma andersoni* en cuatro condiciones ambientales de la Laguna de Zacapu, Michoacán.

Objetivos particulares

- Analizar las diferencias morfológicas en adultos de *Ambystoma andersoni* en cuatro sitios de la Laguna de Zacapu utilizando la técnica de asimetría fluctuante.
- Evaluar el índice de condición corporal como posible respuesta a las condiciones ambientales observadas.
- Conocer la relación entre los parámetros hematológicos como posible respuesta a las condiciones ambientales.
- Establecer la relación entre parámetros hematológicos y características morfológicas de *Ambystoma andersoni* con los parámetros físico-químicos de los sitios de estudio.

HIPÓTESIS

La respuesta de los individuos adultos de *Ambystoma andersoni* determinada mediante la asimetría fluctuante, el índice de condición corporal y los parámetros hematológicos, será diferente a lo largo del año en los cuatro sitios de muestreo en la laguna de Zacapu, de acuerdo a los parámetros físico-químicos determinados en cada uno.

ÁREA DE ESTUDIO

Ubicación y descripción del área

La laguna de Zacapu es un cuerpo de agua considerada perenne, siendo alimentada por cerca de veinte manantiales, con una longitud máxima de 634.55 m y 414.4 m de ancho con un perímetro de 2,173.68 m y un área total de 21,661.59 m² (Huacuz, 2008). Está ubicada al norte de la ciudad de Zacapu, en el municipio del mismo nombre del estado de Michoacán de Ocampo (Fig. 2), entre las coordenadas externas 19° 49' 26" y 19° 49' 40" de latitud norte y 101° 46' 45" y 101° 47' 35" de longitud oeste, (INEGI, 1985) a una altitud de 1,980 msnm. La laguna se localiza dentro de la subcuenca del río Angulo, como parte de la Cuenca Lerma-Chapala. Díaz (1997) realizó un estudio batimétrico donde muestra como la laguna es un cuerpo de agua con un fondo irregular, cuya profundidad máxima es de 16 m. Las riberas del humedal presentan cuatro tipos de uso de suelo; habitacional, agrícola, turístico-recreativo e industrial.

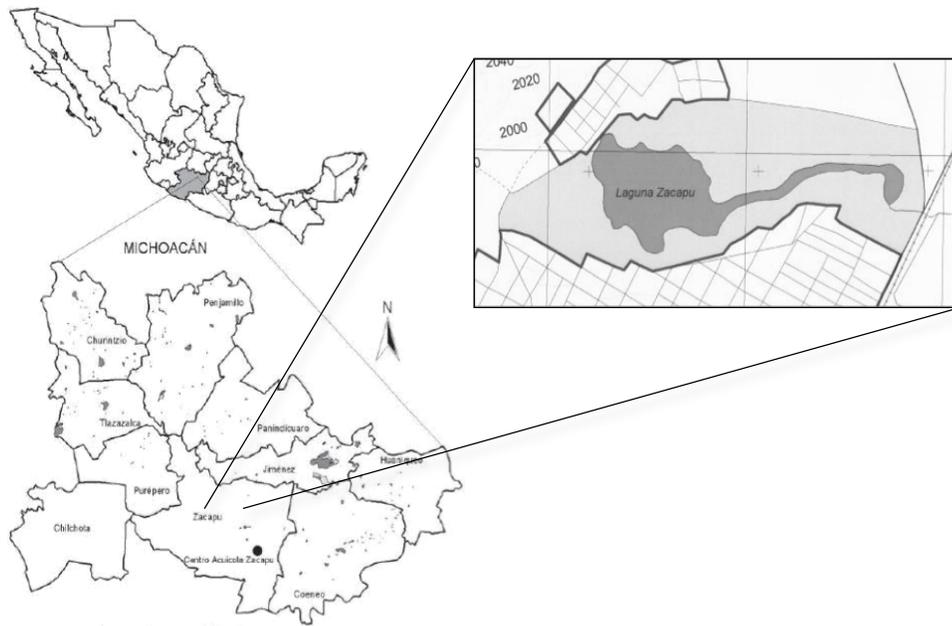


Figura 2.- Ubicación del área de estudio. Tomado y adaptado de Huipe-Ramos y Bernal-Brooks, 2009.

Esta laguna es de importancia biológica y económica, ya que incluye especies endémicas y en algún grado de riesgo (Martínez-Aquino *et al.*, 2007) como *Ambystoma andersoni* endémica y sujeta a protección especial (PR) de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010, *Allotoca zacapuensis* endémica (Meyer *et al.*, 2001) y determinadas categorías de riesgo, como *Anas diazi* (A), *Ardea herodias* (Pr), *Sterna antillarum* (Pr) y *Rallus elegans* (P) entre otras (Ramsar, 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de Muestreo

Se realizaron muestreos mensuales de mayo de 2011 a abril de 2012, para lo cual se establecieron cuatro sitios de muestreo (Fig. 3), de acuerdo a condiciones que presenta la laguna, como tipo de uso de suelo; turístico-recreativo, habitacional, agrícola e industrial, presencia de manantiales y profundidad (Moncayo, 1996, Díaz, 1997, Huacuz, 2008). Los sitios establecidos fueron los siguientes:



Figura 3.- Ubicación de los sitios de muestreo en el humedal “Laguna de Zacapu”, mapa tomado y adaptado de www.ramsar.org, **a** Compuerta de salida del río Angulo.

Sitio 1. "Los Cipreses"

Situado a orillas de un balneario particular en la parte noroeste de la laguna con el mismo nombre, con las coordenadas N $19^{\circ} 49' 28.7''$ y O $101^{\circ} 47' 0.1''$, este sitio presenta condiciones de perturbación como descarga de aguas domésticas y carece de influencia directa de los manantiales. Es una zona con fondo fangoso donde se capturan almejas por parte de los

lugareños. En esta parte se presentan actividades de carácter recreativo-turístico, habitacional y de horticultura (Fig. 4 y 5) (Moncayo, 1996).



Figura 4. Balneario "Los Cipreses"



Figura 5. Horticultura en el sitio 1.

Sitio 2. "La Angostura"

Este sitio se encuentra localizado a un costado de la entrada de un balneario ejidal donde se ubican manantiales con el mismo nombre situados en la parte norte de la laguna bajo las coordenadas N 19° 49' 30.6'' y O 101° 47' 23.6'', siendo un importante entrada de agua para la Laguna, presenta una zona arbolada con *Salix* sp. en un 20% (Fig. 6) como la especie directriz, macrófitas emergentes como *Scirpus* sp en un 15%, *Besula erecta* en un 8% y especies de macrófitos sumergidas como *Potamogeton pectinatus*, *Myriophyllum* sp. y *Ceratophyllum demersum* en un 30%, algunas algas y en parte más somera el agua es transparente.

Sitio 3. "Ojo de Agua"

Situado en la parte sur a un costado de la entrada del manantial del mismo nombre o también conocido por los lugareños como "Ojo de liebre" en las coordenadas N 19° 49' 34.5''

y O 101° 47' 23.8'', es considerado como el manantial de mayor aporte de agua que alimenta la laguna. Es un sitio donde el tipo de uso de suelo es de carácter recreativo y turístico por parte de los pobladores locales y visitantes, donde la especie directriz es *Typha latifolia* encontrándose en un 25% del sitio (Fig. 7), seguida por *Salix sp.* 12%, y *Potamogeton pectinatus*.



Figura 6. Sitio 2 "La Angostura"



Figura 7. *Salix sp.* y *Typha latifolia*. Sitio 3.

Sitio 4. "Río Angulo"

Este sitio se ubica en las coordenadas geográficas N 10° 49' 34.5'' y O 101° 47' 19.3'' se sitúa en la parte de la desembocadura de la laguna donde se origina el Río Angulo, de acuerdo a Diaz (1997) es una de las partes de mayor profundidad en el área; se caracteriza por estar rodeada de especies de tule como *Typha latifolia* 30%, *Scirpus spp* 30%, *Besula erecta* que oscila entre 8 – 15%. En las áreas circundantes a este sitio se presentan algunas actividades de carácter agrícola, el resto son especies de la familia Polygonaceae (*Polygonum punctatum*) y Compositae (*Bidens laevis*), otro tipo de uso de suelo que se presenta en las áreas circunvecinas es el industrial (Fig. 8). Cabe señalar que este sitio de muestreo se ubica antes de la compuerta situada en la parte este del río Angulo.



Figura 8 Uso de suelo de tipo industrial circundante a la laguna. Derecha Río Angulo.

Los organismos adultos de *Ambystoma andersoni* se capturaron con redes de 30 m de largo, 1.5 m de caída con 3.8cm de luz de malla, colocadas aleatoriamente en los sitios. A los organismos colectados se les tomaron medidas biométricas y una muestra de sangre para realizar un frotis.

Evaluación de parámetros físico-químicos

Determinar las características físico-químicas del agua puede indicar la calidad en la que se encuentra el ecosistema (Ortega *et al.*, 2003). En este trabajo se midieron algunos parámetros físico-químicos (i.e. temperatura del ambiente y del agua, oxígeno disuelto, pH, nitritos, cloro libre y transparencia) que se ha determinado que afectan a especies de anfibios, sin embargo es posible que algunas de estas variables se encuentren altamente correlacionadas, para lo cual se realizó un Análisis de Componente Principales y así poder detectar variables que fuesen redundantes.

En cada uno de los sitios de muestreo se tomaron cuatro muestras de agua, el punto donde se colectó la muestra se ubicó a la mitad de cada una de las redes y fueron obtenidas directamente de la laguna a 50 cm de profundidad de la superficie del cuerpo de agua entre las 7:30 y 9hrs. Los parámetros físico-químicos determinados fueron: temperatura del ambiente, temperatura del agua (con un termómetro), nitritos, cloro libre, oxígeno disuelto, pH (se analizaron mediante un laboratorio portátil Hach Industries, modelos DR/890 especial para

acuicultura) y transparencia (mediante un disco de Secchi de 30 cm de diámetro); estos parámetros se tomaron de mayo de 2011 a abril de 2012.

Asimetría fluctuante

Para determinar la asimetría fluctuante (AF) se tomaron mediciones en mm de la longitud de las patas anteriores (LPA), longitud de las patas posteriores (LPP) y longitudes de las branquias (LBR) a todos los individuos adultos colectados de *Ambystoma andersoni* en cuatro sitios de la laguna de Zacapu, en el estado de Michoacán, con un vernier calibrador de 0.01mm de precisión.

Para calcular la AF para todos los caracteres se utilizó la siguiente fórmula:

$$A_i = \sum |D-I|$$

Donde **D-I** es la diferencia entre los caracteres del lado derecho y los caracteres del lado izquierdo y **A_i** es la sumatoria de las diferencias de dichos caracteres medidos por individuo, (Leung, 2000).

Para la muestra se utilizó la fórmula:

$$\sum A_i / N$$

Donde **A_i** es la sumatoria de asimetría por individuo de acuerdo al número total de caracteres bilaterales medidos y **N** el número de individuos de la muestra.

Índice de condición corporal

Para el índice de condición corporal (IC) se tomaron las medidas de longitud hocico-cloaca (LHC), longitud de la cauda (LC) para obtener la longitud total (LT), el peso de los organismos y con ellos se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$IC = W/LT^3 * 10^6$$

Donde **IC** es el índice de condición corporal, **W** es el peso, **LT³** es el largo total elevado al cubo (Tomasevic *et al.*, 2007).

Parámetros hematológicos

Para determinar los parámetros hematológicos de *Ambystoma andersoni* se tomó una muestra de sangre de los filamentos del tercer arco branquial. Se realizó un frotis de sangre periférica conforme al método estándar (Davis y Maerz, 2008; Davis *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2011), se fijaron con alcohol metílico al 99% de pureza; posteriormente se tiñeron las células con la técnica de tinción *Wright* tradicional por 7 min que es un tiempo promedio para la tinción clásica (Arserim y Mermer, 2008). Posteriormente, los frotis fueron observados al microscopio óptico para realizar el conteo de los perfiles leucocitarios que son conteo de linfocitos, monocitos, basófilos, eosinófilos y segmentados (llamados neutrófilos o heterófilos), hasta llegar a un conteo de 200 células por cada individuo colectado, se observaron las muestras con un ocular de 40X y un objetivo de inmersión (100X) para denotar pequeñas diferencias en la coloración y forma de los leucocitos, para posteriormente obtener los porcentajes de los tipos celulares (Álvarez *et al.*, 2011).

Análisis de los datos

Con el objetivo de detectar las correlaciones entre las variables analizadas de los parámetros físico-químicos determinados y ordenarlos de acuerdo a los cuatro sitios por las cuatro temporadas del año, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP).

Se utilizó un modelo lineal generalizado, con el objetivo de determinar si la de AF, el IC y a los parámetros hematológicos de los individuos adultos de *Ambystoma andersoni* presentan diferencias de acuerdo a los factores de variación como son sitio, sexo, temporada, las interacciones de sitio por sexo, sitio por temporada, sexo por temporada y sitio por sexo por temporada, así como a los parámetros físico-químicos determinados en el agua como covariables, debido a alguna condición tanto espacial como temporalmente a lo largo del año. Y para determinar si los resultados de AF, IC y los parámetros hematológicos presentan algún tipo de correlación con los parámetros físico-químicos determinados, se realizaron regresiones lineales simples. Todos los análisis se realizaron con JMP (Statistical Discovery Software, versión 8.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de las respuestas morfológicas, fisiológicas e inmunológicas de una especie silvestre que se encuentran en su hábitat natural, así como de las condiciones ambientales en las que habitan y si esta especie presenta algún nivel de sensibilidad a la perturbación antropogénica, contaminación doméstica e industrial (McCoy y Harris, 2003), puede servir para detectar si los individuos responden a las condiciones ambientales (Doyle y Whiteman, 2008). Por tanto, para determinar la integridad física de una especie, se puede llevar a cabo mediante la evaluación de la respuesta morfológica e inmunológica que presenten así como determinar algunos de los parámetros físico-químicos que más afectan a dicha especie.

a) PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DETERMINADOS

Con un Análisis de Componentes Principales (ACP) se seleccionaron las correlaciones superiores a 0.80 entre las variables físico-químicas, las cuales indican redundancia entre dos variables (para excluir variables altamente correlacionadas) dejando únicamente las variables con correlaciones menores a 0.80 para realizar los análisis estadísticos posteriores. Las variables con mayor redundancia fueron la temperatura ambiental y la transparencia (-0.82), lo que podría ser explicado por la temporalidad que afecta la temperatura ambiental, y con relación a la transparencia se podría ver afectada también por la temporada, en este caso de lluvias, donde la precipitación puede modificar la transparencia en el cuerpo de agua por el ingreso de agua y por arrastre de la misma. Debido a que el interés fue caracterizar los sitios de acuerdo a las condiciones ambientales de la Laguna de Zacapu como cuerpo de agua, la transparencia puede expresar una influencia mayor sobre las propiedades del cuerpo de agua, debido a que la transparencia puede verse afectada por la acumulación de materiales arrastrados por las lluvias desde la parte alta de la cuenca, por la productividad primaria o por la dinámica del movimiento del recurso hídrico en el cuerpo de agua (Parra *et al.*, 1989), por

lo tanto se procedió a quitar a la temperatura ambiente en los análisis presentados para determinar como se encuentran los sitios y si son diferentes temporalmente.

Con ACP de los parámetros físico-químicos determinados como variables, ordenándolos por sitio de acuerdo a las cuatro temporadas del año se pudo observar que (Fig. 9 y Cuadro 1):

Se encontró que el sitio 1 en las temporadas de invierno y de otoño, presentan bajos valores de transparencia y de pH, variando en la cantidad de mg/L de oxígeno disuelto y cloro libre que se presentan en ambas temporadas, siendo menor en otoño. Con respecto a la primavera y verano, en primavera se tienen los valores más bajos de mg/L de cloro libre, los menores valores de transparencia, pH y mg/L de nitritos mientras que en verano se tiene los mayores valores de transparencia, pH, mg/L de oxígeno disuelto y nitritos.

El sitio 2 muestra un gradiente donde los valores altos de transparencia, pH, mg/L de oxígeno disuelto y nitritos se presentan en primavera, seguidos del verano, donde los valores de transparencia, pH, mg/L de oxígeno disuelto y nitritos son menores, hasta llegar a la temporada de otoño, donde estos valores son menores que el verano, en la temporada de invierno se registraron valores similares, en transparencia, pH y nitritos, variando en los mg/L de mg/L de oxígeno disuelto, siendo menor durante invierno la presencia de cloro libre.

El sitio 3 durante la temporada de primavera, se presentan altos valores de transparencia, alto pH, valores altos de mg/L de oxígeno disuelto, y en temporada de invierno se observaron los valores mínimos de cloro libre con respecto, donde la transparencia es menor, disminuye el pH, los mg/L de oxígeno disuelto y nitritos. A diferencia de las temporadas de verano y otoño, donde presentan valores similares de cloro libre, mientras que el verano presenta altos valores de transparencia, pH, mg/L de oxígeno disuelto y nitritos, para la temporada de otoño se presenta los valores mínimos de transparencia, pH, mg/L de agua de oxígeno disuelto y nitritos para los cuatro sitios en las cuatro temporadas.

El sitio 4 en la temporada de primavera es donde se registró la mayor transparencia de los cuatro sitios en las cuatro temporadas, el mayor pH, la mayor cantidad de mg/L de oxígeno disuelto y nitritos, con valores bajos de mg/L de cloro libre, seguido de un gradiente hacia la temporada de verano, donde se registraron menores valores de transparencia, pH, mg/L de oxígeno disuelto y nitritos, variando por bajas concentraciones de mg/L de cloro libre en

ambas temporadas, mientras que en otoño e invierno se registraron valores bajos de transparencia, pH, mg/L de oxígeno disuelto y nitritos, variando por tener en invierno valores mínimos de cloro libre.

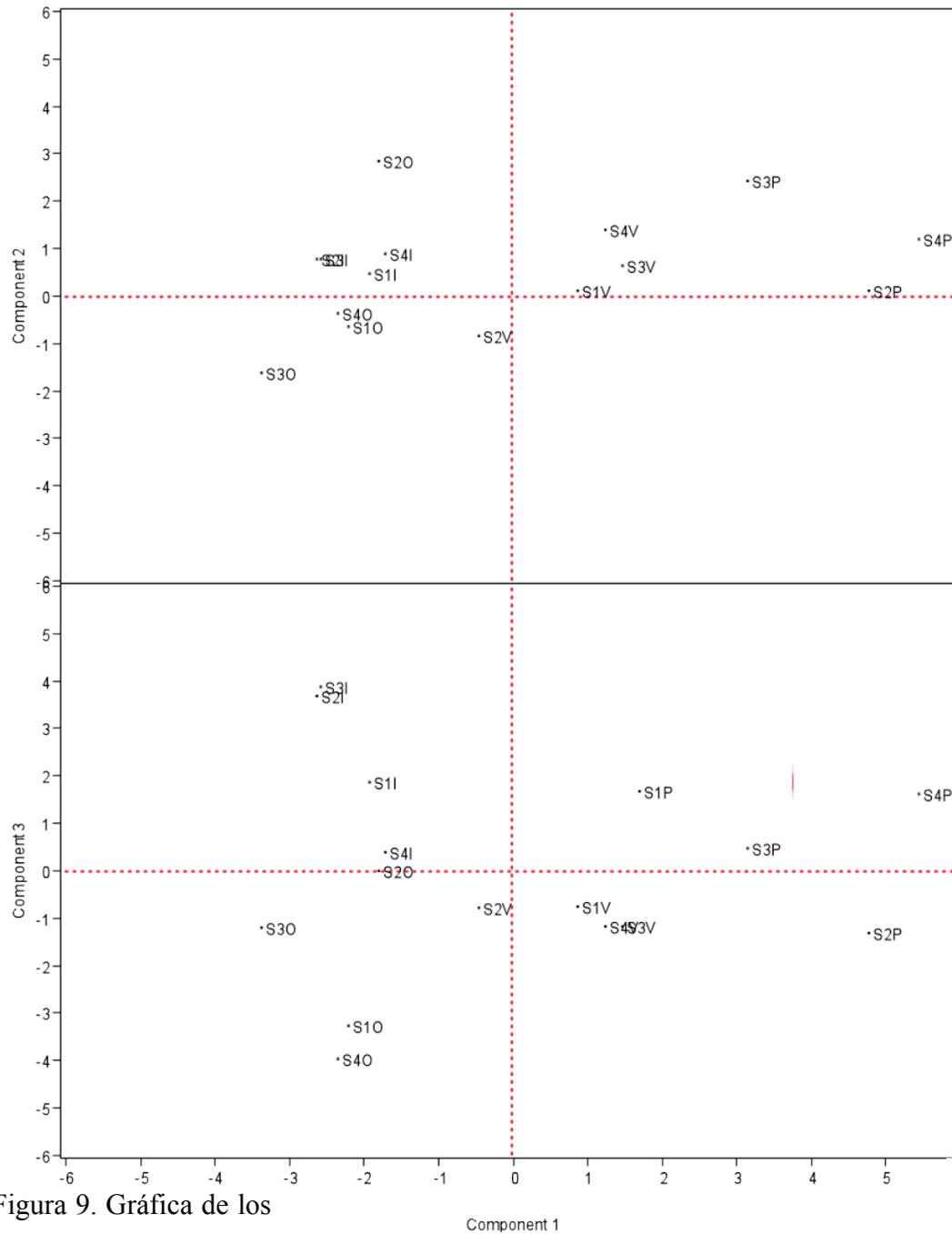


Figura 9. Gráfica de los tres componentes principales, con la ordenación de los parámetros físico-químicos por sitio de acuerdo a la temporada del año.

Cuadro 1. Eigenvectores, dirección e intensidad de efecto de los componentes principales (CP), dada por los primeros tres componentes principales (Eigenvalores)

	CP 1	CP 2	CP 3
T _f Agua Media	0.15116	0.27866	0.12602
T _f Agua Max	0.17663	0.26271	-0.04741
T _f Agua Min	0.01007	0.24514	0.32251
No2-N Media	0.16921	-0.29949	0.13103
No2-N Max	0.27706	-0.16989	0.07798
No2-N Min	0.04679	-0.35675	0.11207
Cloro libre Media	0.12665	0.22317	-0.02677
Cloro libre Max	-0.03861	0.12657	-0.24791
Cloro libre Min	0.04957	0.06068	0.28107
O2 Media	0.28183	-0.04018	-0.13894
O2 Max	0.21649	-0.03346	-0.28678
O2 Min	0.26147	-0.05992	-0.01965
pH Media	-0.20948	0.21034	0.15785
pH Max	-0.09378	0.26677	0.01197
pH Min	-0.24456	0.14780	0.19542
Transparencia Media	-0.21831	0.24163	0.01102
Transparencia Max	0.12773	0.35196	-0.07231
Transparencia Min	-0.30411	0.09832	0.07057

MODELO LINEAL GENERALIZADO

Los cuatro sitios en los que fue dividida la laguna presentaron diferencias en todos los parámetros físico-químicos determinados incluida la temporalidad. Estas diferencias permitieron determinar y caracterizar las condiciones en las que se encuentran los individuos adultos de *Ambystoma andersoni* colectados en la laguna.

Sitio 1 “Los Cipreses”

La temperatura del agua para este sitio fue significativamente más baja 13.29°C que en los demás sitios ($F=60.88$, $g.l.= 3$, $p<0.0001$, ver Apéndice I Fig. 10a) y no se registraron diferencias entre la temporadas de lluvias y secas, siendo en la interacción de sitio por temporada donde se registraron valores bajos para tanto para lluvias como par secas ($\bar{\chi}=13.29$, $ee=0.20$ y $\bar{\chi}=13.28$, $ee=0.23$ respectivamente, $F=17.42$, $g.l. 3$, $p<0.0001$, Fig 10a ver Apéndice I) lo cual esta por debajo de la temperatura reportada para incubación de los huevos de *Ambystoma andersoni* (Huacuz, 2008).

Para el oxígeno disuelto en este sitio se presentó un promedio de altas concentraciones ($\bar{\chi}=12.81\text{mg/L}$, $F=6.34$, $g.l. 3$, $p=0.001$, Fig 11a ver Apéndice I), a su vez el oxigeno disuelto presentó diferencias significativas entre temporada de lluvias y secas, siendo la temporada de secas donde se registró una media mayor 13.43mg/L $ee=0.60$ ($F=39.46$, $g.l. 1$, $p<0.0001$, Fig. 11b ver Apéndice I), lo que podría ser explicado por la productividad primaria, sólo que no esta en los alcances de este trabajo poderlo corroborar debido a que no se midieron niveles de clorofilas.

Con respecto al pH registrado y comparando las medias de todos los sitios, este sitio presenta valores con características que se comparten entre medios y bajos ($\bar{\chi}=7.48$, $ee=0.13$, $F=9.6644$, $g.l. 3$, $p<0.0001$, Fig 12a ver Apéndice I) manteniendose por dentro de los niveles permisibles para la vida silvestre (pH 6.5-8.5, NOM-127-SSA1-1994) y los niveles deseables para anfibios (pH 6 – 8, Odum y Zippel, 2008)

De acuerdo a la presencia de mg de nitritos por litro de agua analizados por sitio, se presentaron diferencias significativas, se observa un patrón, siendo los sitios 1 y 4 los que presentaron las medias de mayor valor 0.42 y 0.36 respectivamente ($F=15.21$, $g.l. 3$, $p<0.0001$, Fig 13a ver Apéndice I). Los nitritos por temporadas presentan diferencia significativa, siendo la temporada de secas donde se registró la media más alta 0.44mg/L de agua ($F=76.42$, $g.l. 1$, $p<0.0001$, Fig 13b ver Apéndice I). En la temporada de secas en este sitio se registraron los valores mayores de mg de nitritos $\bar{\chi}=0.82$ y $ee=0.08$ ($F=14.93$, $g.l. 3$, $p<0.0001$, Fig 13d ver Apéndice I) que son por debajo de los niveles aceptables de nitritos para anfibios ($<1.0\text{mg/L}$, Odum y Zippel, 2008), sin embargo en diferencias espaciales y en temporalidad, supera los niveles permisibles (0.05mg/L, NOM-127-SSA1-1994).

El análisis del cloro libre registrado mostró que el sitio 1 presentó significativamente valores bajos, 0.026mg/L (F=14.82, g.l. 3, p<0.0001, Fig. 14a ver Apéndice I), a su vez no presentó diferencias significativas entre temporadas (F=3.44, g.l. 1, p=0.069, Fig. 14b ver Apéndice I) el cual se mantiene dentro de los niveles permisibles (0.5 – 1.2 mg/L, NOM-127-SSA1-1994).

La transparencia en este sitio es una de las tres más bajas, 87.15cm con ee=2.11 (F=44.03, g.l. 3, p<0.0001, Fig 15a ver Apéndice I), la cual se mantuvo baja para la temporada de secas en todos los sitios, y durante la temporada de lluvias en este sitio se registraron valores medios ($\bar{\chi}$ =123.52cm, ee=2.47, F=44.43, g.l. 3, p<0.0001, Fig 15d ver Apéndice I).

Sitio 2 “La Angostura”

Para este sitio se presentó el promedio mayor de la temperatura del agua 18.29°C (F=60.88, g.l.= 3, p<0.0001, ver Apéndice I Fig. 10a) y como en el sitio 1 para temperatura del agua, no se registraron diferencias por temporadas de lluvias y secas, siendo en este caso altas para ambas temporadas, lo que se mantiene dentro del rango deseable para el crecimiento óptimo de *Ambystoma andersoni* (Huacuz, 2008).

El oxígeno disuelto registrado en este sitio ($\bar{\chi}$ =12.45mg/L, ee=0.45) no presentó diferencias estadísticas con respecto a los valores registrados en el sitio 3 ($\bar{\chi}$ =12.19mg/L, ee=0.38, Fig. 11a ver Apéndice I), al igual que en el sitio 1 y 4 para este parámetro físico-químico la temporada de secas presento mayores valores ($\bar{\chi}$ =13.52mg/L, ee=0.46) con respecto a la temporada de lluvias ($\bar{\chi}$ =11.37mg/L, ee=0.77), lo que podría estar asociado más que a entrada de agua a la laguna a la productividad primaria, sin embargo de acuerdo a los alcances de este trabajo no se puede determinar la causa precisa de este aumento de oxígeno disuelto durante la temporada de secas.

De acuerdo al análisis de las medias de pH registrado para los sitios, este sitio presenta los menores valores $\bar{\chi}$ =7.18 y ee=0.16 (F=9.6644, g.l. 3, p<0.0001, Fig 12a ver Apéndice I) aunado a los sitios 1 y 3 con diferencias en temporada, siendo durante la temporada de lluvias donde se registraron los mayores valores con respecto a la temporada de secas (F=3.15, g.l. 3,

p=0.0323, Fig 12d ver Apéndice I), y estos datos se mantienen dentro de los niveles permisibles para la vida silvestre (pH 6.5-8.5, NOM-127-SSA1-1994) y niveles aceptables para los anfibios (pH 6- 8, Odum y Zippel, 2008).

Los nitritos en este sitio se registraron en menores valores de media 0.08 mg de nitritos por litro de agua (F=15.21, g.l. 3, p<0.0001, Fig 13a ver Apéndice I), inclusive en la interacción de sitio por temporada, tanto en lluvias como en secas se registraron los valores bajos al igual que para el sitio 3 (F=14.93, g.l. 3, p<0.0001, Fig 13d ver Apéndice I). Y se encuentran por encima de los niveles permisibles de para la vida silvestre (0.05mg/L, NOM-127-SSA1-1994).

Al analizar el cloro libre determinado en los sitios, se observan diferencias significativas siendo en este sitio donde se presentó los mg/L de agua promedio mayores 0.29 mg/L, las medias de cloro libre de la interacción sitio por temporada presentaron diferencias estadísticas, siendo en este sitio durante la temporada de lluvias donde se registraron las medias cloro libre más altas 0.43mg/L (F=6.85, g.l. 3, p=0.0006, Figura 14d ver Apéndice I). Los valores de este parámetro se encuentran dentro de los niveles permisibles (0.2–1.5 mg/L, NOM-127-SSA1-1994), sin embargo el cloro libre al ser considerado muy tóxico por dañar el tejido del sistema respiratorio, el nivel aceptable para anfibios es cero (Odum, y Zippel, 2008), no obstante algunas formas adultas parecen ser capaces de tolerar el agua clorada 0.0034mg/L: *Ceratophrys ornata*, *Rana catesbeiana*, *Ambystoma texanum*, *Ambystoma tigrinum*, *Litoria caerulea*, *Ichthyophis kohtaoensis* (Arthur y Eaton, 1971; Culley, 1992; Odum y Zippel, 2008), por lo que es conveniente considerar que en el sitio 2 se encuentran mayores valores de cloro libre durante la temporada de lluvias lo que podría provocar estrés en los individuos.

En este sitio dos con respecto a los cuatros sitios se presentó la media de transparencia de mayor valor 116.3 cm con ee=2.54 (F=44.03, g.l. 3, p<0.0001, Fig 15a ver Apéndice I), siendo durante la temporada de lluvias en este sitio donde se registró la mayor media en cm de transparencia por sitios ($\bar{\chi}$ =181.91, ee=0.12, F=44.43, g.l. 3, p<0.0001, Fig 15d ver Apéndice I). Este sitio en donde se registró mayor transparencia en temporada de lluvias, no obstante este parámetro no es una limitante para que los individuos de *Ambystoma andersoni* se alimenten, no sólo por que no existe correlación de transparencia con peso de los individuos

($r^2=0.000218$ $p=0.8567$), sino que al ser bentónicos se pueden alimentar ampliamente de toda la columna de agua (Huacuz, 2008).

Debido a que el éxito de conservación o recuperación de poblaciones silvestres de organismos acuáticos así como de las especies del género *Ambystoma* depende de que sus hábitats presenten la calidad necesaria, como concentraciones altas de oxígeno, pH neutro, bajo índice de contaminantes, para desarrollar una saludable comunidad biológica (Barbour *et al.* 1999), este sitio en un punto de mayor atención debido a que no es el sitio con concentraciones más altas de oxígeno, es el sitio donde se registran los valores más bajos de pH y las mayores concentraciones de cloro libre en el agua, fuera del los niveles permisibles para una vida saludable en anfibios (Odum y Zippel, 2008).

Sitio 3 “Ojo de agua”

La temperatura del agua para este sitio presentó valores medios con respecto a los sitios anteriores, se registraron diferencias en temporadas, siendo mayor en secas (16.40°C, $F=17.42$, *g.l.* 3, $p<0.0001$, ver Apéndice I Fig. 10b) con respecto a lluvias. Los resultados de analizar el oxígeno disuelto por sitio, muestran que este sitio presenta las menores concentraciones de mg/L ($\bar{\chi}=12.19$, $ee=0.38$, $F=6.34$, *g.l.* 3, $p=0.001$, Fig 11a ver Apéndice I), tanto para temporada de lluvias como para temporada de secas ($\bar{\chi}=12$ mg/L, $ee=0.43$, $\bar{\chi}=12.38$ mg/L, $ee=0.62$ respectivamente). Los valores de pH registrados en este sitio se ubican como intermedios con respecto a los demás sitios ($\bar{\chi}=7.87$, $ee=0.13$, $F=9.6644$, *g.l.* 3, $p<0.0001$, ver Apéndice I Fig. 12a), manteniéndose dentro de los niveles permisibles (pH 6.5-8.5, NOM-127-SSA1-1994) y niveles aceptables para anfibios (pH 6- 8, Odum y Zippel, 2008).

En este sitio como en el sitio 2, se registraron los menores valores de nitritos ($\bar{\chi}=0.07$, $ee=0.05$, $F=14.93$, *g.l.* 3, $p<0.0001$, ver Apéndice I Fig. 13d), tanto para temporada de lluvias ($\bar{\chi}=0.02$, $ee=0.05$) como para temporada de secas ($\bar{\chi}=0.12$, $ee=0.08$). Como se puede observar tanto para la espacialidad como la temporalidad se rebasan los niveles permisibles para la vida silvestre (0.05mg/L, NOM-127-SSA1-1994), no obstante se mantienen por debajo de los niveles aceptables de nitritos para anfibios (<1.0mg/L, Odum y Zippel, 2008).

Mediante el análisis del cloro libre registrado por sitios se observó que este sitio presentó valores bajos, 0.026mg/L ($F=14.82$, *g.l.* 3, $p<0.0001$, Fig. 14a ver Apéndice I). El cloro libre no presentó diferencias significativas entre temporada de lluvias y secas en este sitio manteniéndose dentro de los niveles bajos ($F=6.85$, *g.l.* 3, $p=0.0006$, Fig. 14d ver Apéndice I) y dentro de los niveles permisibles (0.5 – 1.2mg/L, NOM-127-SSA1-1994) pero no dentro de los aceptables para anfibios que es de cero (Odum y Zippel, 2008).

La transparencia en este sitio analizada en espacialidad fue una de las tres más bajas 87.70cm, junto con los sitios 1 y 4 ($F=44.03$, *g.l.* 3, $p<0.0001$, Fig 15a ver Apéndice I), y al analizar la temporalidad se puede observar que durante la temporada de lluvias en este sitio se registran valores medios y durante la temporada de secas siguen siendo bajos ($\bar{\chi}=125$, $ee=2.45$ y $\bar{\chi}=50.40$, $ee=2.61$ respectivamente, $F=44.43$, *g.l.* 3, $p<0.0001$).

Sitio 4 “Río Angulo”

La temperatura del agua registrada para este sitio, presentó valores medios al igual que la del sitio 3. Se registraron diferencias en temporadas, siendo la temporada de secas donde se registró la media alta 16.40°C con respecto a lluvias ($F=17.42$, *g.l.* 3, $p<0.0001$, ver Apéndice I Fig. 10b).

Para el oxígeno disuelto este sitio presentó la mayor media registrada 14.26mg/L ($F=6.34$, *g.l.* 3, $p=0.001$, Fig 11a ver Apéndice I), a su vez el oxígeno disuelto presentó diferencias significativas entre temporadas, siendo la temporada de secas donde se registró una media alta 16.46mg/L ($F=39.46$, *g.l.* 1, $p<0.0001$, Fig 11b), aunado a los sitios 1 y 2, lo que podría ser por el proceso dinámico que ocurre dentro de la algas, que no permite que exista un estancamiento en el agua (Moncayo, 1996), de acuerdo a Wetzel (1981 en Moncayo, 1996) los movimientos del agua contribuyen a la difusión del oxígeno, estos movimientos pueden ser por translocaciones horizontales y algunas corrientes de densidad y podría estar dado por productividad primaria (Parra *et al*, 1989) que por las limitantes en esta trabajo no se pudieron medir como clorofilas, plancton, etc.

En este sitio se registraron los valores más altos de pH ($\bar{\chi}$ =8.39, ee=0.12, F=9.6644, g.l. 3, p<0.0001, Fig 12a ver Apéndice I), inclusive en la interacción sitio por temporada presentándose los mayores valores tanto para temporada de lluvias ($\bar{\chi}$ =8.36, ee=0.08) como para temporada de secas ($\bar{\chi}$ =8.41, ee=0.24), se encuentra dentro de los niveles permisibles (pH 6.5-8.5, NOM-127-SSA1-1994) y niveles aceptables para anfibios (pH 6- 8, Odum y Zippel, 2008).

La cantidad de nitritos determinada por sitios y temporadas se mantuvo por encima de los niveles permisibles (0.05mg/L, NOM-127-SSA1-1994), al analizar la interacción de sitios por temporada se puede observar que los sitios 1 y 4 durante la temporada de secas presentan niveles superiores ($\bar{\chi}$ =0.82 , ee= 0.08 y $\bar{\chi}$ =0.69, ee=0.09, sitio 1 y 4 respectivamente, Fig. 13 ver Apéndice I). No obstante, los niveles que se registraron en los sitios están dentro de los niveles aceptables para anfibios <1.0mg/L (Klingler: 1957; Russo *et al.*, 1974; Westin, 1974; Marco *et al.*, 1999; Whitaker, 2001), debido a que valores superiores a 1.01mg/L de nitritos en el agua pueden ocasionar mortalidad en 15 días de exposición a este compuesto en larvas de *Ambystoma* (Marco, *et al.*, 1999), así como concentraciones superiores a 3.4 mg/L pueden interrumpir en el proceso de eclosión en algunos casos de ranas como en *Rana sylvatica* (Griffis-Kyle, 2005).

Se observó que en el análisis del cloro libre registrado este sitio presentó valores bajos 0.025mg/L (F=14.82, g.l. 3, p<0.0001, Fig 14a ver Apéndice I), y como para los sitios 1 y 3 este tampoco presentó diferencias significativas entre temporada de lluvias y secas, manteniéndose valores bajos (F=6.85, g.l. 3, p=0.0006, Fig. 14d ver Apéndice I). Si bien esta dentro de los niveles permisibles (0.5 – 1.2mg/L, NOM-127-SSA1-1994) pero no dentro de los aceptables para anfibios que es de cero (Odum y Zippel, 2008).

El análisis de la transparencia por sitio permitió observar que los sitios 1, 3 y 4 presentan las medias de menor valor, siendo este sitio 4 donde se registra una $\bar{\chi}$ =80.89, ee=2.02 (F=44.03, g.l. 3, p<0.0001, Fig 15a ver Apéndice I), sin embargo en la temporada de lluvias, en este sitio es donde se registran los menores valores ($\bar{\chi}$ =110.57, ee=1.29, F=44.43, g.l. 3, p<0.0001, Fig 15d ver Apéndice I) para esta tempotada en todos los sitios, y los valores

de secas se comportan al igual que en los tres sitios anteriores, con los valores más bajos ($\bar{\chi}=51.20$, $ee=3.83$, $F=44.43$, $g.l. 3$, $p<0.0001$, Fig 15d ver Apéndice I).

b) ASIMETRÍA FLUCTUANTE, ÍNDICE DE CONDICIÓN CORPORAL, RELACIÓN HETERÓFILO/LINFOCITOS Y PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Individuos capturados

Se capturaron 159 individuos, de los cuales; 84 fueron hembras y 75 machos. Los datos biométricos recabados se muestran en la Cuadro 2.

Cuadro 2.- Datos de las medidas biométricas tomadas para *Ambystoma andersoni*.

Sexo	Peso gr	LHC mm	LC mm	LT mm
H	43-197	91-142	27-125	130-251
	($\bar{\chi}$ 117; $\pm S$ 26)	($\bar{\chi}$ 118.8 $\pm S$ 10)	($\bar{\chi}$ 93; $\pm S$ 18)	($\bar{\chi}$ 211; $\pm S$ 22)
M	64-170	94-140	23-194	118-300
	($\bar{\chi}$ 111; $\pm S$ 24)	($\bar{\chi}$ 115; $\pm S$ 9)	($\bar{\chi}$ 106; $\pm S$ 22)	($\bar{\chi}$ 222; $\pm S$ 25)

De los individuos colectados en los cuatro sitios de muestreo (Fig. 16), el sitio 4 fue en el que se registró la mayor cantidad de individuos: 52 (33%), seguido del sitio 1 con 39 (25%), en el sitio 2 se registraron 38 individuos (24%) y el sitio 3 fue en el que se registró la menor cantidad de individuos con 30 (19%). Con un esfuerzo de muestreo de 2,160 m² red por 663 horas de apertura de redes.

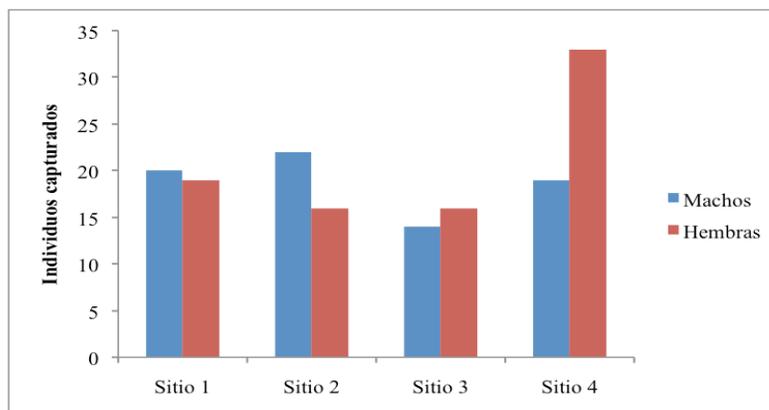


Figura 16. Hembras y machos colectados por sitio.

Asimetría Fluctuante

Con los valores absolutos de las diferencias bilaterales se procedió a probar la normalidad de los datos de acuerdo a las pruebas de Kolmogorov-Smirnov (K-S), y los datos no muestran normalidad ($\bar{\chi}=0.0698$, Desv. Est.=0.0685, N=159, K-S=0.154, $p<0.010$). Posteriormente se prosiguió al utilizar el modelo lineal generalizado con la AF como variable de respuesta y sitio, sexo, temporada, las interacciones sitio por sexo, sitio por temporada, sexo por temporada y sitio por sexo por temporada como factores, y los parámetros físico-químicos determinados como los parámetros que más afectan a los anfibios como covariables, mediante el cual no se registraron diferencias estadísticamente significativas en la asimetría que presentan los individuos por sitio ($F=2.5032$, g.l. 3, $p=0.0621$), no se registraron diferencias por sexo ($F=2.4975$, g.l. 1, $p=0.1165$), por temporada ($F=0.529$, g.l. 1, $p=0.4683$), tampoco se presentaron diferencias dentro de las interacciones como sitio por sexo ($F=2.2446$, g.l. 3, $p=0.0862$), en sexo por temporada ($F=2.8112$, g.l. 1, $p=0.096$), ni dentro de la interacción de sitio por sexo y por temporada ($F=0.6014$, g.l.3, $p=0.6153$) a excepción de la interacción de sitio por temporada ($F=3.3203$, g.l. 3, $p=0.0219$, Fig. 17). Tampoco se presentaron diferencias en los parámetros físico-químicos como covariables; temperatura de agua ($F=0.0105$, g.l.1, $p=0.9186$), nitritos ($F=3.524$, g.l.1, $p=0.0627$), cloro libre ($F=0.6$, g.l.1, $p=0.44$), oxígeno disuelto ($F=0.0101$, g.l.1, $p=0.9199$), pH ($F=1.7002$, g.l.1, $p=0.1945$) y transparencia ($F=0.8146$, g.l.1, $p=0.3684$).

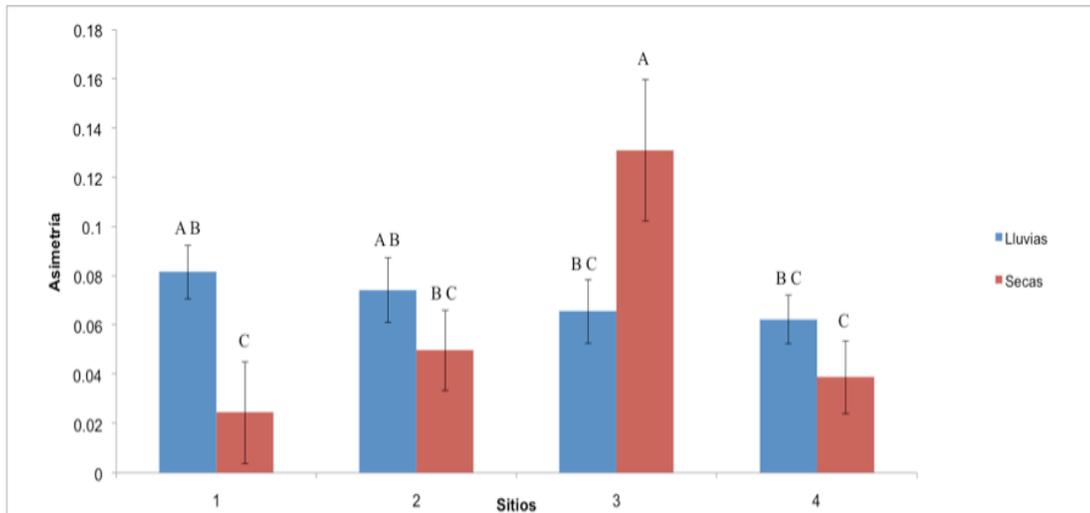


Figura 17. Asimetría observada en sitios por temporadas ($F=3.3203, g.l. 3, p=0.0219$) Letras diferentes sobre cada barra representan diferencias significativas $p>0.05$.

Como la Asimetría Fluctuante (AF) consiste en comparar el grado de simetría de los caracteres bilaterales de los individuos para establecer si las poblaciones están sometidas a estrés, en algunos casos asociado a degradación ambiental (Kozlov, *et al.*, 1996) por lo que conocer las características de los sitios donde son colectados es parte fundamental para determinar si el hábitat es el que está afectando el crecimiento de los individuos. Los resultados muestran que no se presentó AF en esta especie, si bien los individuos presentaron asimetría, esta no fue fluctuante debido a que las premisas de normalidad de los datos, que no se observe direccionalidad y se presente respuesta a algún factor de variación ambiental, no se cumplen y como lo señala Klingenberg (2003) si un organismo expresa asimetría para sus caracteres bilaterales sin ser asimetría fluctuante, significa que ha ocurrido alguna perturbación del individuo durante su desarrollo ontogenético, como resultado de estrés durante su desarrollo embrionario que se mide a través de pruebas durante su crecimiento, más que por factores ambientales directos (Palmer, 2001; Kellner y Alford, 2003; Tull y Brussard, 2006; DeLeón, 2007).

Huacuz (2008) reporta haber encontrado asimetría direccional para cuatro caracteres medidos: longitud de la pata anterior (LPA), longitud de la pata posterior (LPP), longitud de la branquia (LBR) y diámetro del ojo (DO), no encontró diferencias significativas en la asimetría

de los individuos de *Ambystoma andersoni* por sexo, registrando los valores máximo de 0.75 y mínimo de -0.80 y en el presente trabajo se registraron los valores máximo de 0.45 y mínimo de 0. Los resultados muestran que no se encontró diferencia significativa en la asimetría de los individuos por los sitios, lo que podría ser por que existe una mayor variación dentro de los sitios que entre los sitios mismos. Y para conocer más a detalle si se puede registrar AF en esta especie es necesario conocer la estructura genética de la población y la arquitectura de crecimiento de la especie, para determinar específicamente cual es la respuesta a factores estresantes, por lo que el uso de índices como este debe ser utilizado con extrema precaución para no sobredimensionar los resultados (Hogg *et al.*, 2001). Por que en trabajos como el presente, esta medición no arroja información suficiente de si la población se encuentra sometida a estrés como respuesta a alguno de los parámetros físico-químicos que fueron medidos, como parte de cuatro condiciones ambientales diferentes.

Índice de condición corporal

Se utilizó el modelo lineal generalizado con la IC como variable de respuesta y factores de variación se emplearon el sitio, sexo, temporada, las interacciones sitio por sexo, sitio por temporada, sexo por temporada y sitio por sexo por temporada como factores y los parámetros físico-químicos determinados covariables. En el IC sólo se registraron diferencias por sexo ($F=5.8568$, gl.1, $p=0.0168$, Fig. 18), no se registraron diferencias estadísticamente significativas por sitio ($F=1.2134$, gl.3, $p=0.3071$), por temporada ($F=1.3251$, gl.1, $p=0.2516$), en las interacciones de sitio por sexo (gl.3, $F=0.6392$, $p=0.591$), sitio por temporada ($F=0.8691$, gl.3, $p=0.4449$), sexo por temporada ($F=2.918$, gl.1, $p=0.0898$) y sitio por sexo por temporada ($F=0.1061$, gl.3, $p=0.9564$). Tampoco se presentaron diferencias en los parámetros físico-químicos como covariables; temperatura de agua ($F=1.2173$, g.l.1, $p=0.2719$), nitritos ($F=2.9486$, g.l.1, $p=0.1547$), cloro libre ($F=0.0331$, g.l.1, $p=0.08559$), oxígeno disuelto ($F=1.9141$, g.l.1, $p=0.1688$), pH ($F=0.1039$, g.l.1, $p=0.7476$) y transparencia ($F=0.3527$, g.l.1, $p=0.5536$).

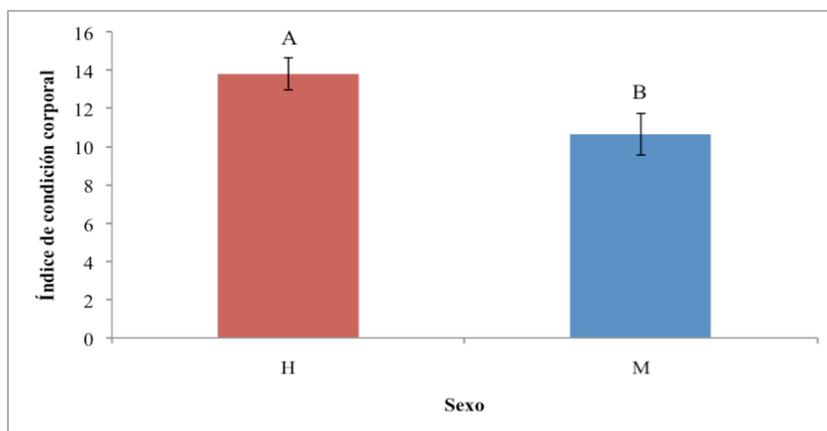


Figura 18. Índice de condición corporal (IC) por sexo ($F=5.8568$, $gl.1$, $p=0.0168$). Letras diferentes sobre cada barra representan diferencias significativas $p>0.05$.

El Índice de Condición Corporal (IC), permite conocer si los individuos tienen reserva de energía que les permita hacer frente a las condiciones ambientales (Stevenson y Woods, 2006). Concordando con lo que Huacuz (2008) quien señala, que *Ambystoma andersoni* presenta valores positivos en este índice y reporta no haber encontrado diferencias significativas entre clases de edad y sexo, esta autora señala los valores máximo de 0.190 y mínimo de 0.040 ($\bar{\chi} = 0.110$, Desv Est 0.016) con el índice propuesto por Heinz-Urlich y Bättig (2004), donde multiplican por 10^4 la relación de peso y volumen, mientras que en este trabajo se utilizó la fórmula propuesta por Tomasevic *et al.*, (2007) que multiplican por 10^6 la misma relación, donde la diferencia es el uso de decimales, en este estudio se obtuvieron los valores máximo de 59.83 y mínimo de 3 ($\bar{\chi} = 12.17$, Desv Est 6.41) que en valores equivalentes el IC registrado en el presente estudio muestra mayores valores de IC, y en los resultados del IC que se determinó si se encontraron diferencias significativas entre sexos, siendo las hembras las de mejor condición corporal.

Se ha observado en urodelos en general debido a que las hembras suelen ser de mayor relación peso-talla, se considera que una explicación favorable a este aumento en esta relación es debido a que las hembras llevan implícitamente una tendencia en su aumento asociada a la formación de huevos (Semlitsch, 1983; Duellman y Trueb, 1994). También se ha observado en individuos paedomórficos del género *Ambystoma*, que las hembras tienen a presentar mayores valores de IC que los machos, atribuido al almacenaje de lípidos que puede ser más importante

en las hembras en relación con la reproducción (Denoël *et al.*, 2002). En este estudio no se obtuvo diferencia en el IC por sitios, por temporadas o dentro de las interacciones de sitio por temporadas, sitio por sexo, sexo por temporadas o sitio por sexo por temporadas. Tampoco se obtuvieron diferencias del IC con respecto a los parámetros físico-químicos determinados y analizados como covariables, en la relación peso-tamaño que presentan los individuos por sitio, y ya que para el IC existe una mayor variación dentro de los sitios que entre los sitios donde están habitando los individuos colectados, se considera que el grado de la condición de los individuos está correlacionado con la energía de reserva que estos poseen independiente de su ubicación Shulte-Hostedde *et al.*, (2005).

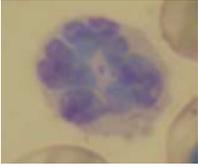
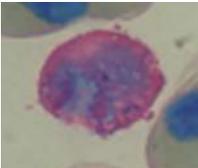
Parámetros hematológicos

Los parámetros hematológicos permiten detectar diferencias en la respuesta inmunológica debida posiblemente a las variaciones ambientales. Los mecanismos de respuesta inmunológicos permiten determinar de forma integral el estado de salud de una población dentro del sitio donde habita (Wright, 2001a; Tok *et al.*, 2009; Cabagna *et al.*, 2011).

Los heterófilos son células que presentan un núcleo en forma de banda con un citoplasma neutro cuando esta inmaduro y cuando el núcleo está maduro se encuentra segmentado. La célula que presenta núcleo ligeramente basófilo con gránulos en coloración ácida dentro del citoplasma es un eosinófilo. Las células que presentan gránulos básicos que se encuentran en todo el citoplasma, inclusive encima del núcleo y que en ocasiones se puede apreciar en la periferia del leucocito son los basófilos (Cuadro 3). Del grupo de los mononucleares podemos encontrar a los linfocitos que son células con la cromatina del mismo tono, muy compacta y poco citoplasma, los monocitos a diferencia de los linfocitos, también son de este grupo de mononucleados, la cromatina es laxa y pueden presentar núcleo arriñonado o lobulado, con un citoplasma color gris y una granulación abundante azurófila

Con los recuentos totales y relativos de leucocitos es posible inferir el estado de salud de poblaciones, ya que sus variaciones cuantitativas y morfológicas se pueden relacionar con procesos inflamatorios, malnutrición y estados de estrés cuando se conocen parámetros previos (Campbel 2004, Barni *et al.*, 2007).

Cuadro 3. Diferencias en tamaño y granulación de leucocitos de *Ambystoma andersoni* .

	Tamaño (μm)	Núcleo	Tinción citoplasma	Granulación
HETERÓFILO 	22 – 33	Polisegmentado	Poco basófilo	Abundante azurófila y neutrófila
EOSINÓFILO 	21 – 32	Redondo o bilobulado	Ligerament e basófilo	Abundante y acidófila
BASÓFILO 	15 -25	Basófilo	Poco basófilo	Abundante purpurea y basofílica
LINFOCITO 	15 – 32	Redondo	Basófilo	-----
MONOCITO 	25 – 38	Irregular con pliegues	Poco basófilo	Abundante azurófila, vacuolas

Comenzando por los mononucleares, el porcentaje de linfocitos presentó diferencias significativas por sitio ($F=8.7114$, g.l.3, $p<0.0001$, Fig. 19a) y por temporada ($F=16.819$, g.l.1, $p<0.0001$, Fig. 19b), sin embargo no se presentaron diferencias en los siguientes factores de variación, por sexo ($F=0.0663$, g.l.1, $p=0.7972$), sitio por sexo ($F=1.204$, g.l.3, $p=0.3106$), sexo por temporada ($F=0.2897$, g.l.1, $p=0.5912$), sitio por temporada ($F=0.7187$, g.l.3, $p=0.5424$), sitio por sexo por temporada ($F=1.1436$, g.l.3, $p=0.3337$), ni en alguno de los parámetros físico-químicos como covariables; temperatura de agua ($F=1.6907$, g.l.1, $p=0.1958$), Nitritos ($F=0.7668$, g.l.1, $p=0.3828$), cloro libre ($F=1.8737$, g.l.1, $p=0.1734$), oxígeno disuelto ($F=2.49$, g.l.1, $p=0.1165$), pH ($F=0.0102$, g.l.1, $p=0.9196$) y transparencia ($F=0.5835$, g.l.1, $p=0.4463$).

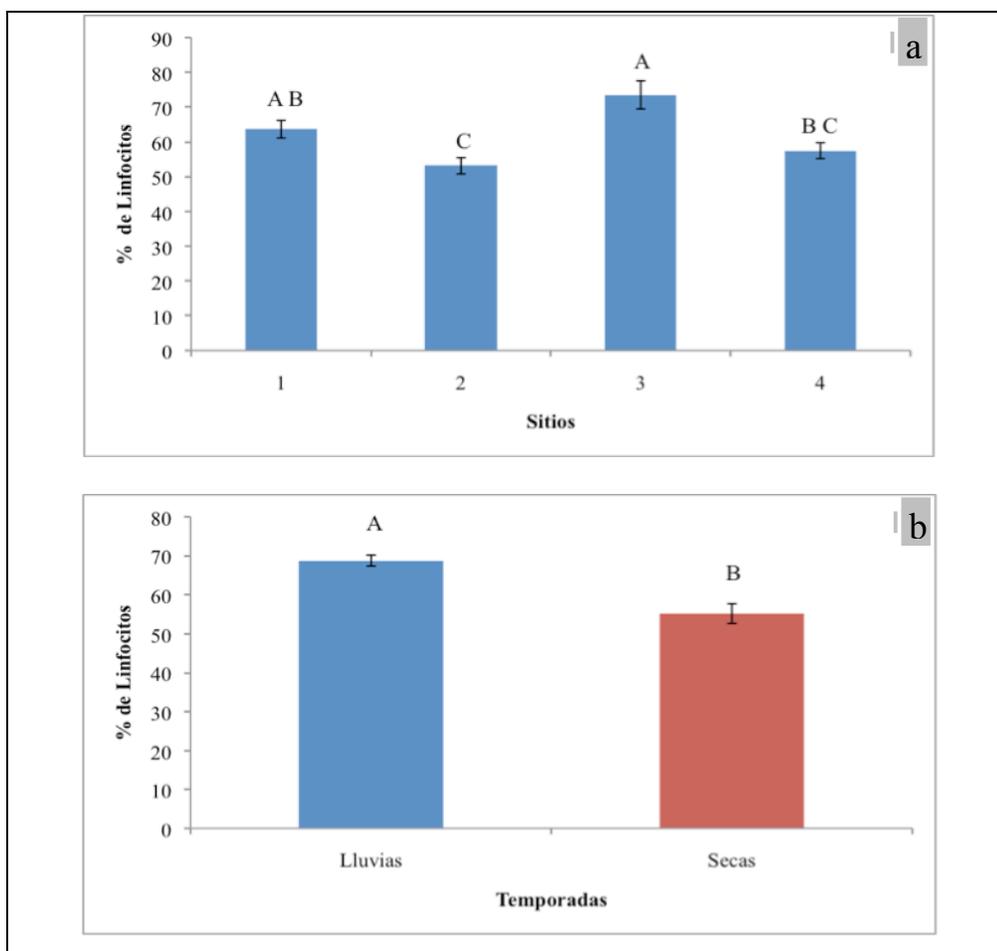
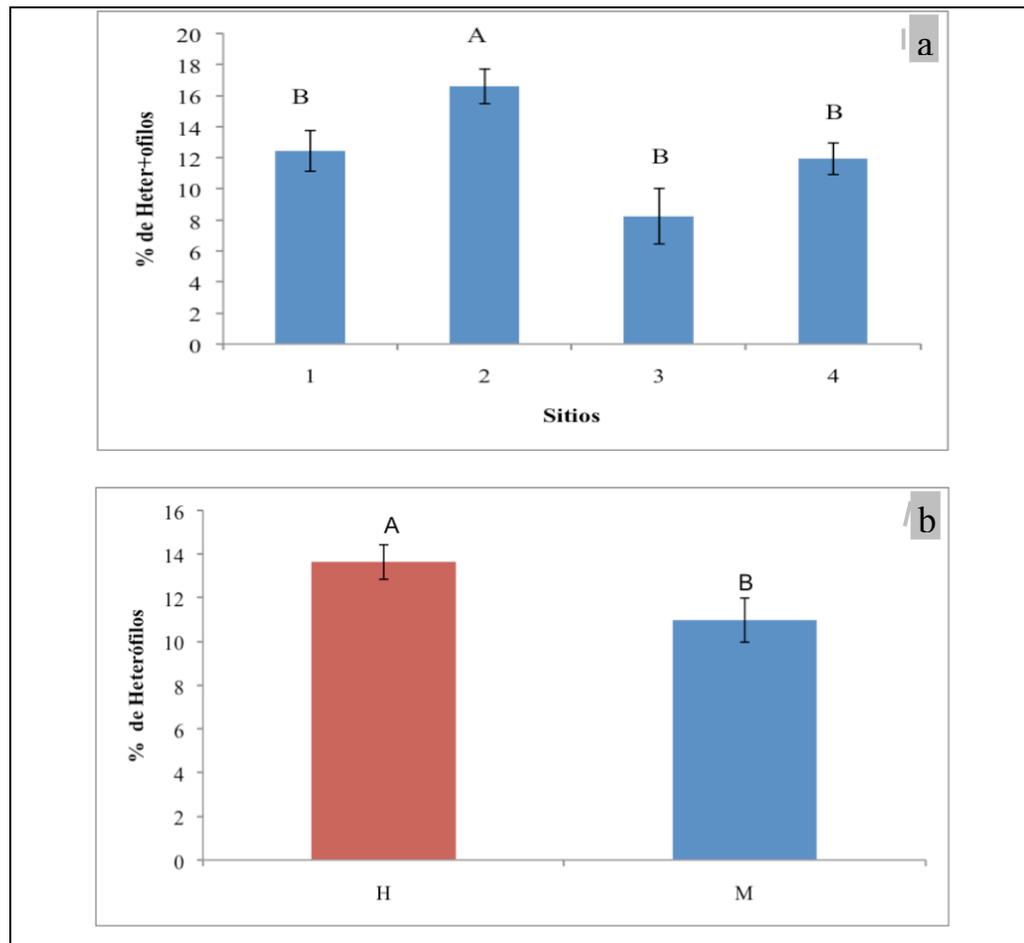


Figura 19. **a** Porcentaje de linfocitos por sitio de muestreo ($F=8.7114$, g.l.3, $p<0.0001$).

b Porcentaje de linfocitos por temporada ($F=16.819$, g.l.1, $p<0.0001$). Letras diferentes sobre cada barra representan diferencias significativas $p>0.05$.

El porcentaje de heterófilos presentó diferencias significativas por sitio ($F=6.3347$, g.l.3, $p=0.0005$, Fig 20a), sexo ($F=4.3512$, g.l.1, $p=0.0389$, Fig 20b), en la interacción de sexo por temporada ($F=7.7389$, g.l.1, $p=0.0062$, Fig 20c) y en la temperatura del agua ($F=5.0736$, g.l.1, $p=0.0260$) y transparencia ($F=5.4466$, g.l.1, $p=0.0211$) sin haber correlación (Para consultar regresiones lineales ver Apéndice II), sin embargo no se presentaron diferencias por temporadas ($F=1.9478$, g.l.1, $p=0.1652$), en las interacciones de sitio por sexo ($F=0.8972$, g.l.3, $p=0.4446$), sitio por temporada ($F=2.025$, g.l.3, $p=0.1136$), ni en sitio por sexo por temporada ($F=1.0052$, g.l.3, $p=0.3928$), ni en los demás parámetros físico-químicos como covariables; temperatura del agua ($F=0.2924$, g.l.1, $p=0.5896$), Nitritos ($F=2.4748$, g.l.1, $p=0.1181$), cloro libre ($F=2.0171$, g.l.1, $p=0.1579$) oxígeno disuelto ($F=1.8326$, g.l.1, $p=0.1781$) y pH ($F=0.0485$, g.l.1, $p=0.8260$).



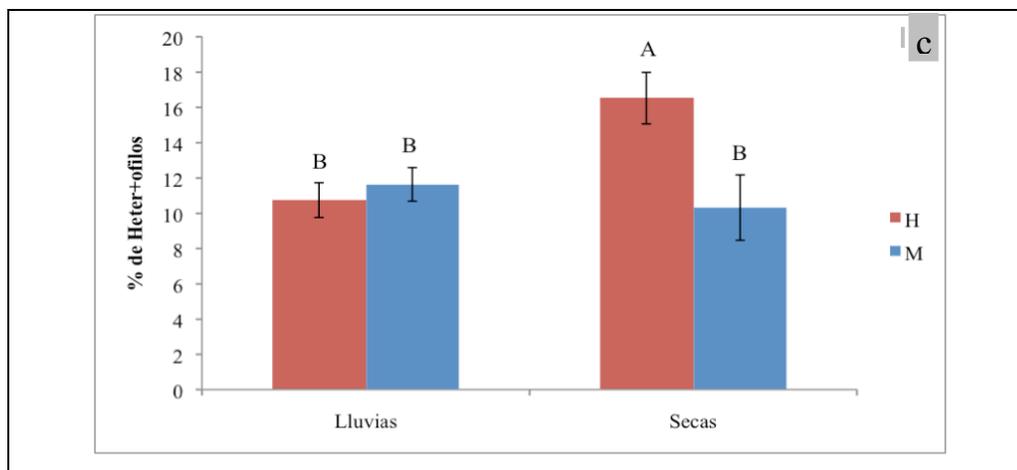
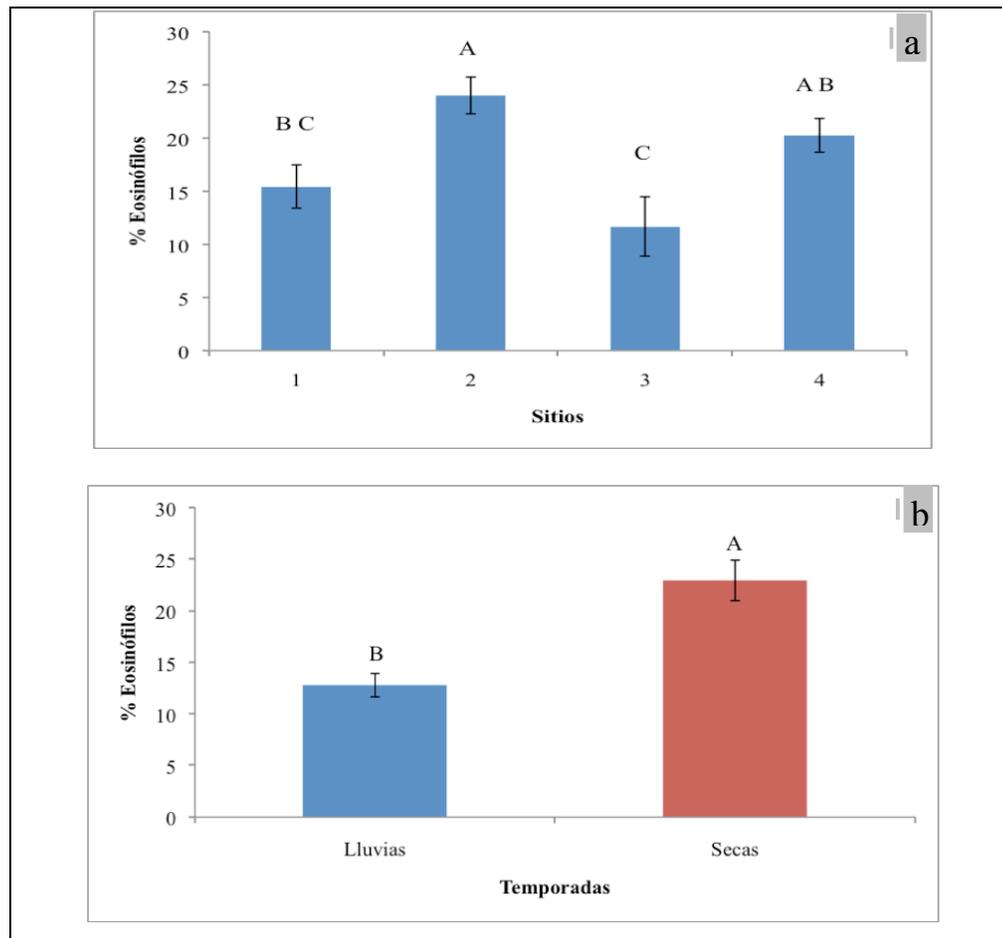


Figura 20. **a** Porcentaje de heterófilos por sitio ($F=6.3347$, g.l.3, $p=0.0005$). **b** Porcentaje de heterófilos por sexo ($F=4.3512$, g.l.1, $p=0.0389$). **c** Porcentaje de heterófilos, sexo por temporada ($F=7.7389$, g.l.1, $p=0.0062$). Letras diferentes sobre cada barra representan diferencias significativas $p>0.05$.

Para heterófilos las diferencias por sexo dentro de las temporadas, denota la sensibilidad de los heterófilos a las condiciones en el ambiente (Davis *et al.*, 2008; Davis y Maerz, 2008; Davis y Maerz, 2009) siendo estas una de las principales células de respuesta en el sistema inmunológico por condiciones ambientales. Por lo tanto al observar la diferencia por sitios y un aumento de estos valores en el sitio 2, y mediante la caracterización de sitio 2 “La angostura” se puede observar que es el sitio donde se presentan los valores más altos temperatura en el agua, tanto en temporada de lluvias como en temporada de secas, es el sitio que presenta los mayores valores de cloro libre, bajos valores de oxígeno disuelto en el agua y los menores valores de pH. Si se toma en cuenta que el pH esta estrechamente relacionado con las reacciones producto de los procesos que se llevan dentro de un cuerpo de agua, debido a partículas como carbonato de calcio, los fosfatos, los nitratos, y compuestos clorados así como sedimentos de desechos orgánicos, que en algunas ocasiones son generados por condiciones anaeróbicas (Parra 1989; Parra *et al.*, 1989).

El porcentaje de eosinófilos presentó diferencias significativas por sitio ($F=6.2297$, g.l.3, $p=0.0006$, Fig 21a), por temporadas ($F=16.7731$, g.l.1, $p<0001$, Fig 21b), y en la

interacción de sitio por sexo ($F=2.9132$, g.l.3, $p=0.0369$, Fig 21c), sin embargo no se presentaron diferencias por sexo ($F=3.2197$, g.l.1, $p=0.0751$) en las interacciones de sitio por temporada ($F=0.7334$, g.l.3, $p=0.5339$), ni en sitio por sexo por temporada ($F=0.8714$, g.l.1, $p=0.3523$), en la interacción de sitio por sexo por temporada ($F=1.6354$, g.l.3, $p=0.1844$), ni en los parámetros físico-químicos como covariables; temperatura de agua ($F=0.0593$, g.l.1, $p=0.808$), nitritos ($F=0.0937$, g.l.1, $p=0.7601$), cloro libre ($F=1.2278$, g.l.1, $p=0.2699$), oxígeno disuelto ($F=0.0894$, g.l.1, $p=0.7654$), pH ($F=0.1117$, g.l.1, $p=0.7387$) y transparencia ($F=0.084$, g.l.1, $p=0.7724$).



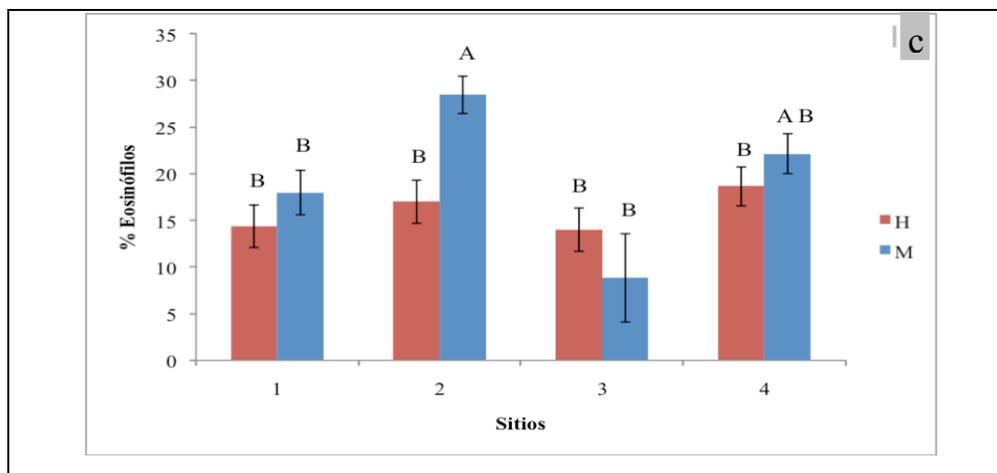


Figura 21. **a** Porcentaje de Eosinófilos por sitio ($F=6.2297$, g.l.3, $p=0.0006$).

b Porcentaje de Eosinófilos por temporadas ($F=16.7731$, g.l.1, $p<0001$).

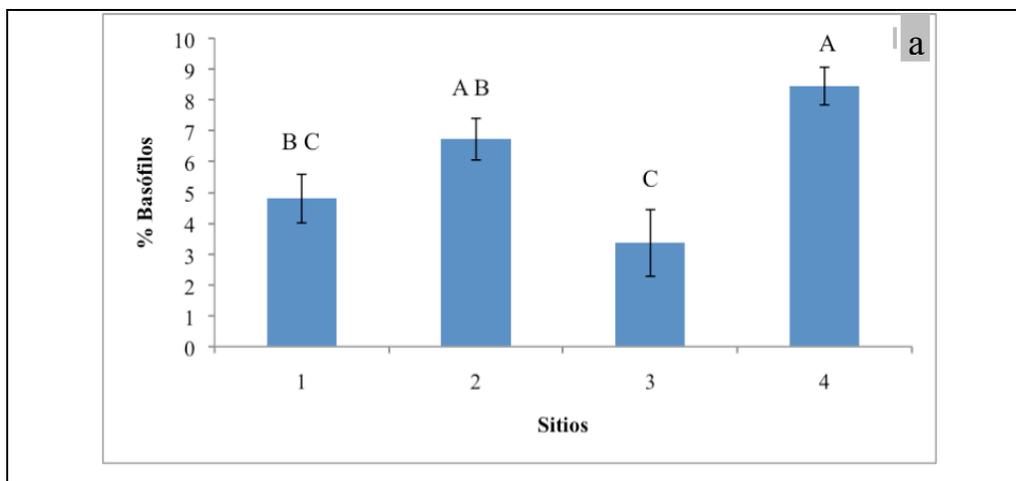
c Porcentaje de Eosinófilos en la Interacción de sitio por sexo ($F=2.9132$, g.l.3, $p=0.0369$). Letras diferentes sobre cada barra representan diferencias significativas $p>0.05$.

Los trabajos relacionados en la última década que tratan de parámetros hematológicos con anfibios mencionan a los cinco tipos de leucocitos como parte de lo realizado (Wright, 2001a; Davis y Maerz, 2008; Tok *et al.*, 2009; Cabagna *et al.*, 2011;) sin embargo, células como los eosinófilos, basófilos y monocitos no han sido sujeto de discusión la variación en sus porcentajes, comparado con los linfocitos y heterófilos que son más sensibles por que se ha demostrado cambios en sus valores cuando el ambiente no les es favorable (Campbel 2004, Barni *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2008; Davis y Maerz, 2008; Davis y Maerz, 2009), se ha trabajado en observar que determinar si se observan malformaciones en células como eosinófilos asociadas a enfermedades crónicas (Thrall, *et al.*, 2012) por lo tanto, en este trabajo se reportan los valores de estos tres leucocitos sin hacer una discusión de los valores encontrados.

Los porcentajes de leucocitos determinados en los individuos de *Ambystoma andersoni*, concuerdan en general con los porcentajes determinados para otros anfibios (Thrall, *et al.*, 2012). Se pudo observar que los heterófilos y eosinófilos no presentaron malformaciones, las cuales se asocian a enfermedades crónicas influidas por factores

ambientales, por lo que en general, se infiere que los individuos colectados presentan buenas condiciones de salud. Sin embargo, es importante considerar los focos de alerta que se detectaron de acuerdo a los niveles de contaminantes permisibles para anfibios. Como el sitio 2 “La Angostura”, que es el sitio con los mayores niveles de cloro libre, el cual es el que queda suspendido en el agua después de las reacciones químicas que ha desencadenado (como la lisis bacterias y otros microorganismos, *etc...*), es el cloro más tóxico debido a que destruye el tejido de órganos respiratorios, no es un compuesto altamente estable químicamente y no es acumulable (Di Marzio y McInnes, 2005).

El porcentaje de basófilos presentó diferencias significativas por sitio ($F=8.1156$, g.l.3, $p<0.0001$, Fig 22a) y por temporadas ($F=25.9549$, g.l.1, $p<0001$, Fig 22b), sin embargo no se presentaron diferencias por sexo ($F=0.3073$, g.l.1, $p=0.5803$) en las interacciones de sitio por sexo ($F=1.1299$, g.l.3, $p=0.3395$), en sitio por temporada ($F=1.1797$, g.l.3, $p=0.3201$), sexo por temporada ($F=0.7341$, g.l.1, $p=0.3931$) en sitio por sexo por temporada ($F=0.9662$, g.l.3, $p=0.4108$), ni en los parámetros físico-químicos como covariables; temperatura de agua ($F=2.7417$, g.l.1, $p=0.1002$), nitritos ($F=0.0024$, g.l.1, $p=0.9613$), cloro libre ($F=0.295$, g.l.1, $p=0.588$), oxígeno disuelto ($F=3.7430$, g.l.1, $p=0.0551$), pH ($F=0.8451$, g.l.1, $p=0.3596$) y transparencia ($F=0.8947$, g.l.1, $p=0.346$).



b

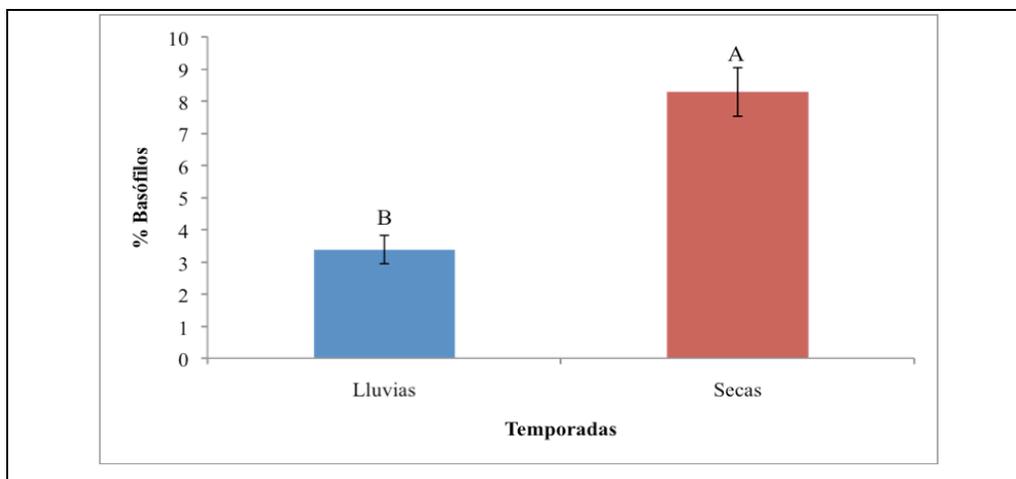


Figura 22. **a** Porcentaje de Basófilos por sitios ($F=8.1156$, g.l.3, $p<0.0001$).

b Porcentaje de Basófilos por temporadas ($F=25.9549$, g.l.1, $p<0.0001$). Letras diferentes sobre cada barra representan diferencias significativas $p>0.05$.

El porcentaje de monocitos presentó diferencias significativas por temporada ($F=9.2036$, g.l.1, $p=0.0029$, Fig. 23), con respecto al cloro ($F=5.3366$, g.l.1, $p=0.0225$, correlacionados marginalmente Fig. 24) y al oxígeno disuelto ($F=5.1698$, g.l.1, $p=0.0246$), sin embargo no se presentaron diferencias por sitio ($F=0.652$, g.l. 3, $p=0.5831$), sexo ($F=1.0992$, g.l.1, $p=0.2964$), en las interacciones de sitio por sexo ($F=1.3742$, g.l.3, $p=0.2536$), en sitio por temporada ($F=0.0171$, g.l.3, $p=0.9969$), sexo por temporada ($F=0.0635$, g.l.1, $p=0.8015$) en sitio por sexo por temporada ($F=0.3221$, g.l.3, $p=0.8094$), ni en los demás parámetros físico-químicos como covariables; temperatura de agua ($F=0.1736$, g.l.1, $p=0.6776$), nitritos ($F=0.0028$, g.l.1, $p=0.9576$), pH ($F=2.8599$, g.l.1, $p=0.0931$) y transparencia ($F=1.755$, g.l.1, $p=0.1876$).

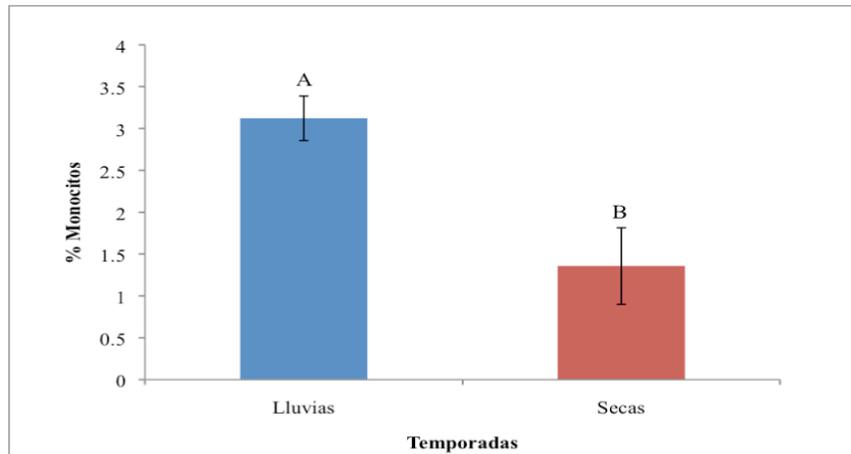


Figura 23. Porcentaje de monocitos por temporada (F=9.5364, g.l.1, p=0.0024). Letras diferentes sobre cada barra representan diferencias significativas $p > 0.05$.

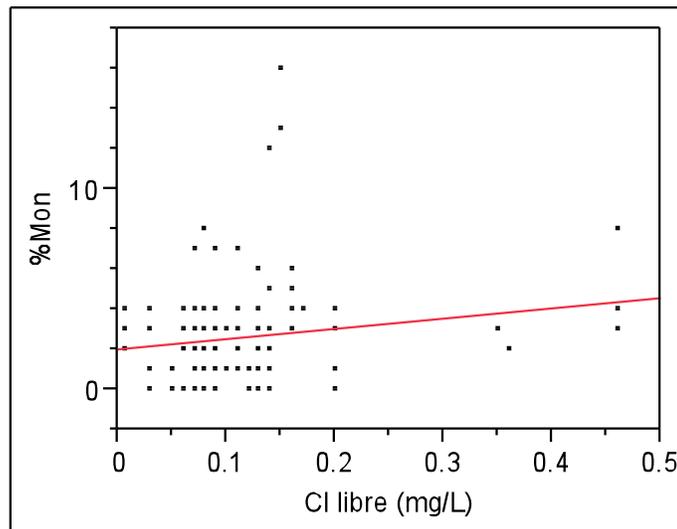


Figura 24. Regresión lineal simple, eje de las x mg/L de cloro libre, y porcentaje de monocitos.
 $\%Mon = 1.954941 + 5.1964581 * Cl \text{ libre (mg/L)}$, $p=0.0462$.

La relación de heterófilos/linfocitos (H/L) presentó diferencias significativas por sitio (F=8.2236, g.l. 3, $p < 0.0001$, Fig. 25a), por temporadas (F=8.8345, g.l. 1, $p=0.0035$, Fig 25b) y en la temperatura del agua (F=6.9899, g.l. 1, $p=0.0092$) sin haber correlación (Para consultar regresión lineal ver Apéndice II), sin embargo no se presentaron diferencias por sexo (F=0.0001, g.l. 1, $p=0.9914$), en las interacciones de sitio por sexo (F=1.4035, g.l.3, $p=0.2447$), en sitio por temporada (F=1.4866, g.l.3, $p=0.2212$), sexo por temporada

($F=1.2406$, g.l.1, $p=0.2674$) ni en sitio por sexo por temporada ($F=1.2074$, g.l.3, $p=0.3097$), ni con los parámetros físico-químicos como covariables; temperatura del agua ($F=2.2614$, g.l.1, $p=0.135$), nitritos ($F=0.7686$, g.l.1, $p=0.3823$), cloro libre ($F=3.7664$, g.l.1, $p=0.0544$), oxígeno disuelto ($F=2.65$, g.l.1, $p=0.1056$), pH ($F=0.3021$, g.l.1, $p=0.5835$) y transparencia ($F=2.9677$, g.l.1, $p=0.0873$).

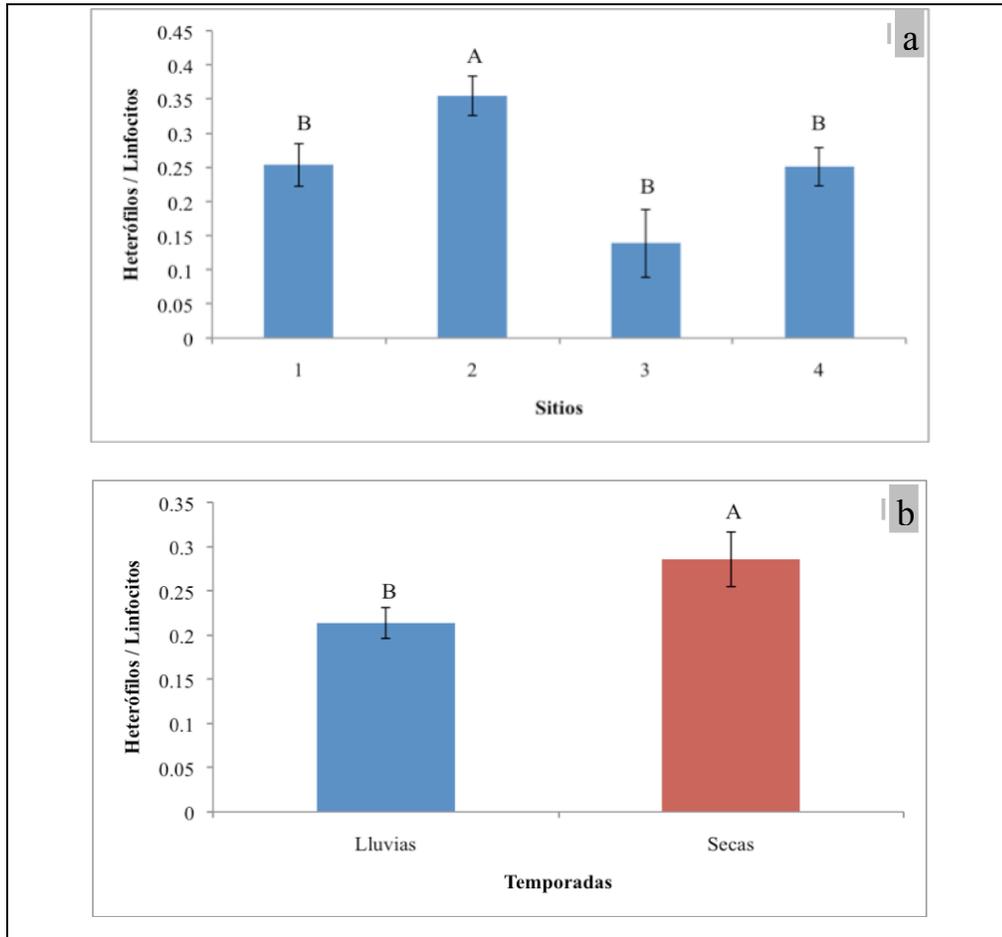


Figura 25. **a** Relación H/L por sitios ($F=8.2236$, g.l. 3, $p<0.0001$). **b** Relación H/L por temporada ($F=8.8345$, g.l. 1, $p=0.0035$) . Letras diferentes sobre cada barra representan diferencias significativas $p>0.05$.

Realizar conteos de leucocitos permitió determinar que los individuos que se colectaron en el sitio 2 “La Angostura” presentaron un valor mayor en el índice Heterófilo/Linfocito (H/L). Este índice que permite determinar si los individuos están siendo sometidos a estrés por fluctuaciones en el ambiente, por lo que, valores cercanos uno muestran

estrés debido a que se ha registrado que individuos con este valor cercano a uno viven menos tiempo y son más propensos a enfermedades que aquellos con valor cercano a cero (Davis *et al.*, 2008; Davis y Maerz, 2008; Davis y Maerz, 2009; Cabagna *et al.*, 2011), debido a que estos dos tipos de células blancas son más sensibles a cambios fisiológicos en el organismo (Davis y Maerz, 2008). Los individuos colectados en este sitio presentaron los altos valores de H/L y podrían estar indicando que estos individuos están sometidos a estrés ambiental, ante las condiciones que este sitio presenta.

Después de haber realizado las correlaciones de cada una de las variables de respuesta como AF, IC, H/L y demás parámetros hematológicos, se analizó el peso corporal de los individuos con respecto a las variables físico-químicas determinadas en cada sitio de muestreo. Se observa que hay una relación inversamente proporcional a los niveles de cloro y a la temperatura del agua ($r^2=0.03925$ $p=0.0144$, $r^2=0.042319$ $p=0.0110$, respectivamente, Fig. 26 y 27) y directamente proporcional con el pH ($r^2=0.110926$ $p=0.0048$, Fig. 28). Al analizar la relación de los niveles de nitritos con el peso se observa que este no se ve afectado por la presencia de los nitritos ($r^2=0.000428$ $p=0.8003$).

Lo que afectó el peso de los individuos de forma negativa es la presencia del cloro libre, registrando pesos bajos en altas concentraciones de cloro libre ($\bar{\chi}=108.139$, $ee=3.9023$), otro de los factores que fue determinante en el peso de los organismos de acuerdo a los parámetros físico-químicos determinados fue el pH, se registraron individuos con mayor peso en mayores valores de pH ($\bar{\chi}=127.442$, $ee=3.2469$), lo que podría ser explicado por la correlación negativa entre el pH y el cloro libre, registrando menores valores de pH en mayores concentraciones de cloro libre ($r^2=0.235774$ $p<0.0001$, Fig 29). En cuanto a la transparencia no es limitante para que *Ambystoma andersoni* no sólo por que presente altos pesos ($r^2=0.000218$ $p=0.8567$), sino por que Huacuz (2008) reporta que *Ambystoma andersoni* puede alimentarse libremente de toda la columna de agua. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio pueden indicar que los individuos de *Ambystoma andersoni* no respondieron morfológicamente de forma esperada a las fluctuaciones ambientales con excepción, con excepción del peso a las concentraciones de cloro libre superiores a 0.1791 mg/L. Otro de los factores que fue determinante en el peso de los organismos es el pH, se registraron individuos con mayor peso en mayores valores de pH ($\bar{\chi}=127.442$, $ee=3.2469$), lo

que podría ser explicado por la correlación negativa entre el pH y el cloro libre, registrando menores valores pH en mayores concentraciones de cloro libre ($r^2=0.235774$ $p<0.0001$).

En este estudio la AF y el IC no respondieron de forma tal que se pudieran relacionar con las cuatro condiciones ambientales que se analizaron de las que habita, se presenta asimetría en los caracteres bilaterales de los individuos como posible respuesta a estrés durante el desarrollo embrionario (Klingenberg, 2003; Kellner y Alford, 2003) más que por los factores ambientales (Palmer, 2001; Tull y Brussard, 2006; DeLeón, 2007), por lo que una forma de corroborar esto es mediante determinar la genética de la población así como la arquitectura de su crecimiento (Hogg *et al.*, 2001). Las hembras presentan mayor IC como posible respuesta a los periodos de vitelogénesis (Semlitsch, 1983; Duellman y Trueb, 1994).

El conteo de leucocitos de acuerdo con los resultados de este trabajo se muestra como una herramienta importante como respuesta inmunológica de *Ambystoma andersoni* en diferentes condiciones ambientales. Los heterófilos toman importancia debido a que las hembras presentaron diferencias significativas en el porcentaje de este tipo celular, siendo mayores en temporada de secas que en temporada de lluvias, lo que podría estar dado por el estrés que provocan los cambios de temporada como fluctuaciones en el ambiente que no se perciben en una respuesta morfológica no obstante sí a través de una inmunológica (Davis y Maerz, 2008, Davis y Maerz, 2009). Los porcentajes de leucocitos en el perfil leucocitario fueron diferentes por sitios como respuesta a las condiciones ambientales (parámetros físico-químicos que se determinaron), lo cual se ve reflejado en el peso de los individuos, lo que muestra diferencias por sitio con respecto a los leucocitos y el peso de los mismos, siendo el índice de H/L (el cual se asoció a las altas concentraciones de cloro libre, temperatura del agua y bajo pH que fueron registrados) el que evidenció que los individuos están siendo sometidos a estrés (Davis *et al.*, 2008, Cabagna *et al.*, 2011).

Ambystoma andersoni es una especie endémica o microendémica (Huacuz, 2008) donde su hábitat se encuentra inmerso en una ciudad, con márgenes delimitados por la presión antropogénica (Monayo, 1996) como reducto de una ciénega de gran extensión (Cayetano-Reyes, 1982). La especie de estudio presenta buena salud, sin embargo es recomendable fijar la atención en ubicar los medios de ingreso del cloro a la laguna, debido a que este supera los niveles deseados para la sobrevivencia de anfibios en buenas condiciones de salud ambiental

(Odum y Zippel, 2008) y es en el sitio 2 “La Angostura” con mayores temperaturas del agua, mayores niveles de cloro libre y menores valores de pH, en este sitio precisamente donde los organismos exhiben una respuesta inmunológica al estrés que este medio les presenta, y el cloro libre esta correlacionado con el porcentaje de monocitos por temporada, los cuales se encargan principalmente de fagocitar microorganismos o restos celulares (Thrall *et al.*, 2012).

Esta especie puede ser un buen modelo para trabajar de forma *ex situ*, no sólo por su dieta variada (Huacuz, 2008) sino porque en condiciones de cautiverio se deberá extremar precauciones en controlar o limitar el uso de cloro en los estanques para evitar la presencia cloro libre y pH ácido, debido a que con pH alcalino y temperaturas estables no superiores a los 20°C (Huacuz, 2008) se puede obtener individuos con buen peso. La presencia de nitritos, ni la visibilidad influyen su peso, de acuerdo a los datos determinados.

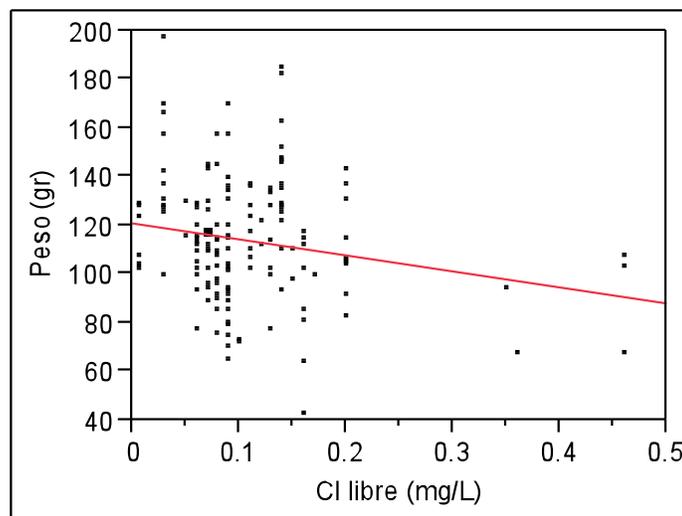


Figura 26. Regresión lineal de la correlación de peso y cloro $\text{Peso (gr)} = 121.13969 - 66.954103 * \text{Cl libre (mg/L)}$. $p=0.0144$

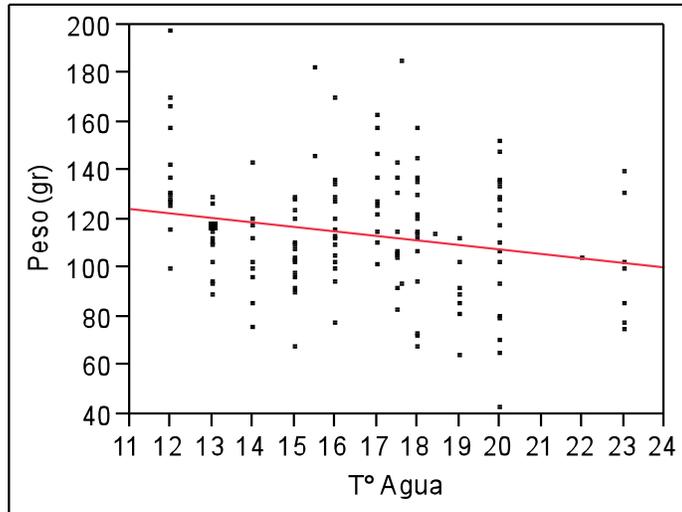


Figura 27. Regresión lineal de la correlación de peso y temperatura del agua. $\text{Peso (gr)} = 144.3009 - 1.8216189 \cdot \text{T}^\circ \text{ Agua}$. $p=0.0110$

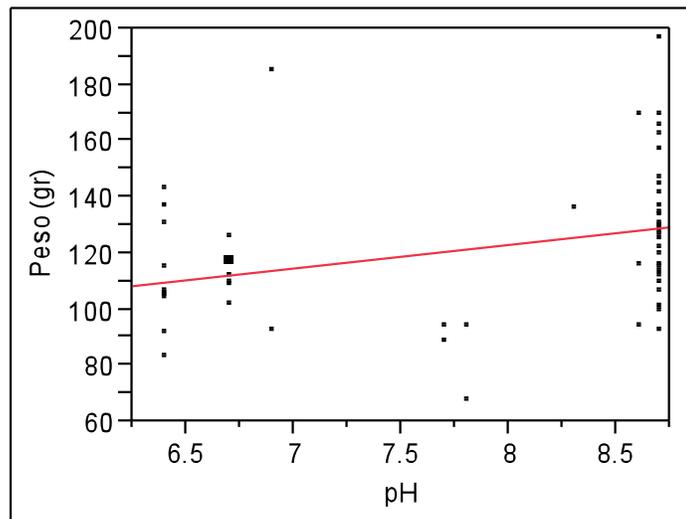


Figura 28. Regresión lineal de la correlación de peso y pH. $\text{Peso (gr)} = 56.099688 + 8.3778878 \cdot \text{pH}$. $p=0.0048$

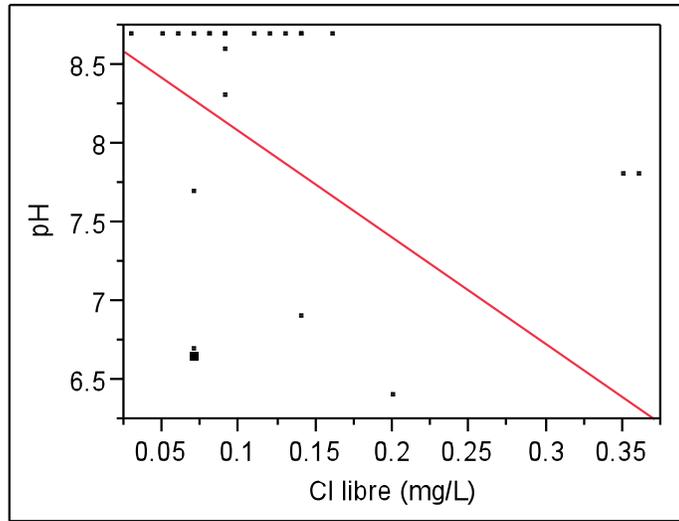


Figura 29. Regresión lineal de la correlación entre pH y cloro libre. $\text{pH} = 8.7587135 - 6.7776241 \cdot \text{Cl libre (mg/L)}$. $p < 0.0001$.

CONCLUSIONES

- El sitio 1 “Los Cipreses” presenta menores valores de temperatura del agua, tanto en temporada de lluvias como en temporada de secas. Valores altos de oxígeno disuelto. Los cuerpos de agua llevan a cabo procesos dinámicos como dilución cuando hay entrada de agua y concentración en temporada de secas, lo que favorece la concentración de solutos como los nitritos, que presentaron valores altos en temporada de secas.
- El sitio 2 “La Angostura” presenta los valores más altos de temperatura en el agua, tanto en temporada de lluvias como en temporada de secas. Es el sitio con menores valores de pH. Es un foco rojo debido a los altos niveles de cloro como contaminante en niveles no permisibles para los anfibios, siendo con ello y las temperaturas de agua mayores. Presenta mayor transparencia en temporada de lluvias.
- El sitio 3 “Ojo de agua” presenta valores altos de temperatura del agua durante secas y bajos en lluvias. Los valores más bajos de oxígeno disuelto en temporada de lluvias como en temporada de secas. Valores altos de pH en lluvias y bajos en secas. Valores bajos de nitritos, cloro, y medios de transparencia.
- El sitio 4 “Río Angulo” presenta temperaturas medias, los valores más altos de oxígeno disuelto. Valores más altos de pH (sitio alcalino) durante temporada de lluvias y secas. Valores altos de nitritos en temporada de secas.
- El cloro libre parámetro determinado como contaminantes, se encuentra dentro de los niveles permisibles, pero los nitritos exceden los valores permisibles (Cloro libre 0.2-1.50mg/L y Nitritos 0.05mg/L , NOM-127-SSA1-1994), lo que no permite determinar con precisión la salud ambiental de la laguna de Zacapu.

- La asimetría que registran los individuos adultos de *Ambystoma andersoni* como una respuesta morfológica no es fluctuante, podría ser direccional como respuesta a estrés durante el desarrollo embrionario.
- Las hembras de *Ambystoma andersoni* presentan una mayor condición corporal que los machos, lo que podría ser debido al hecho implícito de un aumento de peso de las hembras por la formación de huevos. Donde este índice tampoco nos arrojó información con respecto a como responde la población a las cuatro condiciones ambientales trabajadas.
- El método que aportó información acerca de cómo responden los individuos colectados a cuatro condiciones ambientales, tanto por sitio como temporalmente, fueron los parámetros hematológicos. Los cinco tipos de leucocitos presentaron diferencias en porcentajes tanto espacial como temporalmente, siendo los heterófilos los más sensibles a las condiciones ambientales, ya que las hembras presentaron mayor porcentaje de heterófilos durante la temporada de secas, como respuesta a esta condición de temporalidad.
- Los porcentajes de los cinco tipos celulares son similares a los de otros anfibios estudiados. Los heterófilos y eosinófilos no presentan malformaciones como respuesta crónica a sitios ambientales insalubres. Las condiciones ambientales donde habitan, les permiten completar el ciclo de la respuesta inmunológica eficazmente.
- El sitio 2 “La Angostura” es en el que se encuentran los individuos más estresados, como respuesta a las condiciones en el hábitat con relación H/L ($\bar{\chi}=0.35$, $ee=0.028$) mayor que los otros tres sitios. Los valores cercanos a 1 pueden ser individuos más propensos a enfermedades, y que para otras especies esta probado pueden llegar a vivir menos que aquellos con valores cercanos a cero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Miguel, X., Gerardo Legorreta B., y G. Casas-Andreu. 2009. Reproducción Ex situ en *Ambystoma granulosum* y *Ambystoma Lermaense* (Amphibia: Ambystomatidae). Acta Zoológica Mexicana, 25: 443-454.
- Al-Murrani, W.K., Al-Rawi, A.J., Al-Hadithi, M.F. and B. Al-Tikriti. 2006. Association between heterophil/lymphocyte ratio, a marker of 'resistance' to stress, and some production and fitness traits in chickens. British Poultry Science, 47: 443–448.
- Álvarez, Mendoza, F.J., Tamez Cantú, E.M., Lazcano, D., Setser, K.W. y Mociño Deloya, E. 2011. Ciencia Universidad Autónoma de Nuevo León, 14: 53-59.
- Antaramián, H., E. y G. Correa P. 2003. Fisiografía. Pp. 172-177. En: SEP-UMSNH 2003. Secretaría de Educación Pública en Michoacán y Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Atlas Geográfico del Estado de Michoacán. Segunda Edición. Editora EDDISA, México. 308 pp.
- Arriaga, Cabrera, L., V. Aguilar Sierra, J. Alcocer Durand, R. Jiménez Rosenberg, E. Muñoz López, E. Vázquez Domínguez. 1998. Regiones hidrológicas prioritarias. Escala de trabajo 1:4 000 000. 2ª. edición. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad,. México.
- Arthur, J. W. and Eaton, J. G. 1971. Chloramine toxicity to the amphipod, *Gammarus pseudolimnaeus*, and the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 28: 1841–1845.
- Arserim, Suha Kenan and Mermer, Ahmet. 2008. Hematology of the Uludag Frog, *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 in Uludag National Park (Bursa, Turkey). E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 25:39-46.
- Barbour, M.T., J. Gerritsen, B.D. Snyder, and Stribling J.B. 1999. Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, Second Edition. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C.

- Barni, S., E. Boncompagni, A. Grosso, v. Bertone, I. Freitas, M. Fasola and C. Fenoglio. 2007. Evaluation of *Rana ssk* esculenta blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquat. Toxicol*, 81: 45-54.
- Boyacioglu, H. 2007. Development of water quality index based on of European classification scheme. *Water*, 33: 101-106
- Brandon, R. A. 1989. Natural History of the Axolotl and Relationship to other Ambystomatid Salamanders. In Armstrong, J.B. and G.M. Malacinski . *Developmental Biology of the Axolotl*, Oxford University Press, New York. pp 13-21.
- Brito Lárez, W. R. y C. J. Ramos Brito. 2010. Comportamiento de un humedal construido para tratar el efluente de sépticos en un automotel ubicado en el municipio ubicado en el municipio Bolívar del Estado Anzoátegui. Universidad de Oriente, Venezuela. Barcelona. 223 pp
- Burton, T. M.; Uzarski, D. G.; Gathman, J. P. and Genet, J. A. 1999. Development of a preliminary invertebrate index of biotic integrity for Lake Huron coastal wetlands. *Wetlands*, 19: 869-882.
- Cabagna, M., R.C. Lajmanovich, Attademo M. A, Peltzer P.M., Junges C.M., Biancucci G.F. y A. Bassó. 2011. Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islands del río Parana, Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 59: 17-28.
- Cabagna, M., R.C. Lajmanovich, G. Stringhini and P.M. Peltzer. 2005. Hematological studies in the common toad (*Bufo arenarum*) in agrosystems of Argentina. *Applied Herpetology*, 2: 373-380.
- Campbell, T.W. 2004. Hematology of Lower vertebrates. International veterinary Information Service, Ithaca, Nueva York, EEUU. 5pp.
- Caro T. and G. O'Doherty. 1999. On the use of surrogate species in conservation Biology. *Conservation Biology*, 13: 805-814.
- Casas, A.G., A.R. Cruz y Aguilar M.X. 2004. Un regalo poco conocido de México al Mundo: El Ajolote o Axolot (*Ambystoma*; Caudata: Ambhibia), con algunas notas sobre la crítica situación de sus poblaciones. *Ciencia Ergo Sum*, 10: 304-308.

- Cayetano-Reyes. 1982. "Las tierras creadas del noroeste de Michoacán" en *Relaciones. Estudios de historia y sociedad*. Zamora, El Colegio de Michoacán, 3: 33-48.
- Ceballos, C., R., Moncayo, G. Contreras, y Cortés M. A. 1992. Estudio Limnológico de la Laguna de Zacapu, Michoacán, México. Presentado en el Segundo Encuentro Universitario de Investigación Científica, Tecnológica y Humanística, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Culley, D. D. 1992. Managing a bullfrog research colony. In *The care and use of amphibians, reptiles, and fish in research*. Schaeffer, D. O., Kleinow, K. M. & Krulisch, L. Science Center for Animal Welfare. pp 30–40.
- Davis, A.K. and A.M. Durso. 2009. White blood cell differentials of northern cricket frogs (*Acris C. Crepitans*) with a compilation of published values from other amphibians. *Herpetologica*, 65: 260-267.
- Davis, A.K. and Maerz, J.C. 2008a. Sex-related differences in hematological stress indices of breeding, paedomorphic mole salamanders. *Journal of Herpetology*, 42: 197–201.
- Davis, A.K. and Maerz, J.C. 2008b. Comparison of hematological stress indicators in recently captured and captive paedomorphic mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*. *Copeia*, pp 613–617.
- Davis, A.K. and Maerz, J.C. 2009. Effects of larval Density on Hematological Stress Indices in Salamanders. *Journal of Experimental Zoology*, 311A: 697-704.
- Davis, A.K., Maney, D.L. and J.C. Maerz. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22: 760-772.
- DeLeón, Valerie B. 2007. Fluctuating Asymmetry and Stress in a Medieval Nubian Population. *American Journal of Physical Anthropology*, 132: 520–534
- Díaz-Argüero, M. 1997. Diagnóstico del estado trófico de la laguna de Zacapu, Michoacán. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.
- Di Marzio, W. y R. McInnes. 2005. Informe de Misión Santuario Carlos Anwandter (Río Cruces), Chile. Misión Consultiva Ramsar: Chile. 55pp.

- Diller, L.V. and R.L. Wallace, 1996. Distribution and Habitat of *Rhyacotriton variegatus* in Managed Young growth forest in North Coastal California. *Journal of Herpetology*, 30: 184-191.
- Domínguez-Domínguez, O., Pérez-Rodríguez, R., Escalera-Vázquez, L., Doadrio, I., and Doadrio, I. 2009. Two new species of the genus *Notropis Rafinesque*, 1817 (Actinopterygii, Cyprinidae) from the Lerma River Basin in Central Mexico. *Hidrobiológica*, 19: 159-172.
- Doyle, J.M. y H. H. Whiteman. 2008. Paedomorphosis in *Ambystoma talpodeideum*: effects of inicial body size variation and density. *Oecología*, 156: 87-94.
- Duellman, W.E. and L. Trueb, 1994. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, New York.
- Flores, V. O. y Canseco M. L. 2004. Nuevas especies y cambios taxonomicos para la herpetofauna de Mexico. *Acta Zoologica Mexicana*, 20: 115-144.
- García-Belenguer, S., Mormede, P. 1993. Nuevo concepto de estrés en ganadería: psicología y neurobiología de la adaptación. *Investigation Agricultural*, 8: 87-107.
- Gonzáles, S., S., H. M García P., A. Chacón T. y C. González R. 1993. *Conceptos Básicos para el estudio del Zooplancton Dulceacuícola*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Escuela de Biología, Laboratorio de Biología Acuática. 52 pp.
- Griffis-Kyle, K.L. 2005. Ontogenic delays in effects of nitrite exposure on tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum tigrinum*) and wood frogs (*Rana sylvatica*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24: 1523-1527
- Hogg I. D., Eadie, J.M., Williams D. D., and D. Turner. 2001. Evaluating fluctuating asymmetry in a stream-dwelling insect as an indicator of low-level thermal stress: a large-scale field experiment. *Journal of Applied Ecology*, 38:1326-1339.
- Huacuz-Elias.D. 2001. *Estado de Conservación del género Ambystoma en el estado de Michoacán, México*. UNAM, UMSNH- SEMARNAT, México. ISBN 968-817-391-6.
- Huacuz-Elias, Dolores del C. 2002. *Programa de Conservación y Manejo de Ambystoma dumerilii, el Achoque del Lago de Pátzcuaro*. UMSNH, FMCN A.C. y SEMARNAT, México.

- Huacuz-Elias, Dolores del C. 2003, Estado de Conservación de *Ambystoma rivulare* Taylor (1940), en el Santuario Sierra Chincua de la Reserva de la Biosfera "Mariposa Monarca". *Biológicas*, 5: 51-63
- Huacuz-Elias, Dolores del C. 2008. *Biología y conservación del género Ambystoma*, en Michoacán, México. Tesis Doctotal. Universidad de Salamanca, Salamanca, España. 403 pp.
- Huggins, P., Johnson C., Schoergendorfer A., Putta S., Stromberg A., and S.R. Voss. 2011. Identification of thyroid hormone responsive genes from the brain of the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology and Toxicology*, 155: 128-135.
- Jerrett, D. P., and C. E. Mays. 1973. Comparative hematology of the hellbender, *Cryptobranchus alleganiensis* in Missouri. *Copeia*, 1973: 331–337.
- Jonsson B. and N. Jonsson. 2001. Review Paper Polymorphism and speciation in Artic charr. *Journal of Fish Biology*, 58: 605-638.
- Kellner J.R. and R. A. Alford. 2003. The Ontogeny of Fluctuating Asymmetry. *The American Naturalist*, 161: 931-947.
- Klingler, K. 1957. Sodium nitrate, a slow acting fish poison. *Schweizerische Zeitschrift fuer Hydrologie*, 19: 565–578.
- Klingenberg, C. P. 2003. A developmental perspective on developmental instability: theory, models, and mechanisms. *Developmental instability: causes and consequences*. Oxford University Press, New York, New York, USA. pp 14–34
- Kozlov, M.V., B.J. Wilsey, J.Koricheva & Haukioja E. 1996. Fluctuating asymmetry of birch leaves increases under pollution impact. *Journal of Applied Ecology*, 33: 1489-1495.
- Krebs, S.L. and Brandon R.A. 1984. A new species of salamander family Ambystomatidae) from Michoacán, México. *Herpetologica*, 40: 238-245.
- Larson A. 1991. A molecular perspective on the evolutionary relationships of the salamander families. *Evolutionary Biology*, 25: 211-277.

- Larson, A. and Dimmick W.W. 1993. Phylogenetic relationships of the salamander families: A analysis of congruence among morphological and molecular characters. *Herpetological Monographs*, 7: 77-93.
- Leung B., M.R. Forbes and D. Houle. 2000. Fluctuating asymmetry as a biondicator of stress: comparing efficacy of analyses involving multiple traots. *American Naturalist*, 155: 101-115.
- Madrigal, S. X. 2003. "Flora". Capitulo VI. Flora y Fauna. En Atlas geográfico del Estado de Michoacán. Correa, P. G., F. Vargas, T., J. S. L. Bravo. M., S. Figueroa. Z., G. Sánchez D., E. Antaramian, H., X. Madrigal S., J. A. Arevalo. G., G. Vargas. J., J. M. Macias. M., V. Duran C., J. M. Espinosa G., C. Rieder E., y F. J. Morett., 2a edición edit – EDDISA - México. 454 pp.
- Manglik, P. K., Johnston, J. R., Asano, T., Tchobanoglous, G. 1987. Effect of particles on chlorine disinfection of wastewater. *Water Reuse Symposium IV "Implementing Water Reuse"*. Denver: AWWA.
- Marco, A., Quichano, C. and A.R. Blaustein. 1999. Sensitivity to nitrate and nitrite in pond-breeding amphibians from the Pacific Northwest, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18: 2836–2839.
- Martínez-Aquino, Andres, Aguilar- Aguilar Rogelio, Del Conde-Juárez Hamlet O. Santa Anna y Raúl Contreras-Medina. 2007. Empleo de herramientas panbiogeográficas para detectar áreas para conservar: Un ejemplo con taxones dulceacuícolas . *Biodiversidad de la faja Volcánica Transmexicana*, UNAM, México, D.F. pp. 449-460.
- McCoy, K.A. and Harris R.N. 2003. Integrating Developmental Stability Analysis and current Amphibian Monitoring Techniques: An Experimental Evaluation with the salamander *Ambystoma maculatum*. *Herpetologica*, 59:22-36.
- Meyer, M. K., A. C. Radda, O. Domínguez. 2001. Notes on the genera *Neophorus* Hubbs and Turner, 1937 and *Allotoca* Hubbs and Turner, 1937, with description of a new species of *Allotoca* from Laguna de Zacapu, Michoacán, México (Teleostei, Ciprinodontiformes: Goodeidae). *Annalen Desnaturhistorischen Museumsin Wien*, 103: 453-460.

- Millar, J. S., and G. J. Hickling. 1990. Fasting endurance and the evolution of mammalian body size. *Functional Ecology*, 4:5–12.
- Monaghan, JR, Walker JA, Beachy CK, Voss SR. 2007. Microarray analysis of early gene expression during natural spinal cord regeneration in the salamander *Ambystoma mexicanum*. *Journal of Neurochemistry*, 101: 27-40.
- Moncayo, R., 1996. Estructura y Función de la Comunidad de Peces de la Laguna de Zacapu, Michoacán, México. Tesis del M.C. en Manejo de Recursos Marinos, La Paz, Baja California Sur. 172 pp.
- Mooney, H.; Lubchenco, J.; Dirzo, R. y Sala, O. 1995. Biodiversity and ecosystem functioning basic principles. En, Heywood V. H. *Global biodiversity assessment*. UNEP, Cambridge University Press. Cambridge. pp 275-326.
- Northington, C. W., Chang, S. L., McCabe, L. J. 1970. Health aspects of wastewater reuse. En: *Water quality improvement by physical and chemical processes III*. Washington D. C.: Symp. JAWWA.
- Odum, R. A., McClain, J. M. and Shely, T. C. 1984. Hormonally induced breeding and rearing of white's treefrog, *Litoria caerulea* (Anura: Pelodyadidae). In *Proceedings 7th reptile symposium on captive propagation husbandry*, July 26–29, 1983, Dallas, Texas. Tolson, P. J. Thurmont, MD: Zoological Consortium, pp 42–52.
- Odum, R.A. y K.C. Zippel, 2008. Amphibian water quality: approaches to an essential environmental parameter. *International Zoo Yearbook*, 42: 40–52
- Ortega, M., Martínez F., Padilla F. 2003. Aspectos metodológicos para evaluar la calidad ambiental de los humedales. Departamento de biología vegetal y ecología. Universidad de Almería. España. pp 125-137.
- Page, R.B., Voss S.R., Samuels A.K., Smith J.J., Putta S. and C. K. Beachy. 2008. Effect of thyroid hormone concentration on the transcriptional response underlying induced metamorphosis in the Mexican axolotl (*Ambystoma*). *BMC Genomics*, 9: 78 .
- Palmer A. R. and C. Strobeck. 2001. *Fluctuating Asymmetry Analyses Revisited*. Oxford University Press. pp 279-319.

- Palmer, A.R. 1994. Fluctuating asymmetry analysis: a primer. In T.Markow (Ed.), *Developmental Inestability: Its Origins and Evolutionary Implications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht the Netherlands.
- Parra O. 1989. La eutrofización de la Laguna Grande de San Pedro, Concepción, Chile: un caso de estudio. *Ambiente y Desarrollo*. Chile, 1: 117-136.
- Parra O., V. Dellarossa, M. Conejeros, H. Campos y W. Steffens. 1989. Estado de eutrofización de las lagunas Grande de San Pedro y las Tres Pascualas. Universidad de Concepción. Ediciones especiales, Europa-Latinoamérica (EULA), Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 174pp.
- Pérez-Castillo A.G. y A. Rodríguez. 2008. Índice fisicoquímico de la calidad de agua para el manejo de lagunas tropicales de inundación. *Revista de Biología Tropical*, 56: 1905-1918.
- Rangel C. J. 1991. "Estudio de la Calidad del Agua en la Cuenca del Río Angulo" Comisión Nacional del Agua, Michoacán, México.
- Rouf, M.A. 1969. Hematology of the Leopard frog, *Rana pipiens*. *Copeia*, 4: 682-687.
- Rouse, J. D., Bishop, C. A. and Struger, J. 1999. Nitrogen pollution: an assessment of it threats to amphibian survival. *Environmental Health Perspectives*, 107: 799–803.
- Russo, R. C., Smith, C. E. and R. V. Thurston. 1974. Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31: 1653–1655.
- Schulte-Hostedde, A. I., J. S. Millar, and G. J. Hickling. 2001. Evaluating body condition in small mammals. *Canadian Journal of Zoology*, 79: 1021–1029.
- Schulte-Hostedde A, Zinner B, Millar JS, Hickling GJ . 2005. Restitution of mass-size residuals: validating body condition indices. *Ecology*, 81: 155–163
- Secretaría de Programación y Presupuesto, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 1985. Síntesis Geográfica del Estado de Michoacán. INEGI, México, D.F.

- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, 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. Diario Oficial de la Federación, 30/12/2010, Ciudad de México.
- Stevenson, R.D. and Woods W.A. Jr 2006. Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integrative and Comparative Biology*, 46:1169-90
- Swaddle, J.P., S.W. Witter and Cuthill I.C. 1994. The analysis of fluctuating asymmetry. *Animal Behaviour*, 48: 986-989.
- Thrall, M.A. 2004. Hematology of amphibians, *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry: Text and Clinical Case Presentations*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Tihen, 1969. The nomenclatural history of genus *Ambystoma*. *Catalogue of American Amphibians and Reptiles*, 75: 1-4.
- Tomašević, N., Cvetković, D., Aleksić, I. and J. Crnobrnja-Isailović. 2007. Effect of climatic conditions on post-hibernation body condition and reproductive traits of *Bufo bufo* females. *Archives of Biological Science Belgrade*, 59: 51-52
- Tok, C. V., Tosunoğlu M., Ayaz D., Çiçek and Ç. Gül. 2009. Hematology of the Lycian Salamander, *Lyciasalamandra fazilae*. *North-Western Journal of Zoology*, 5: 321-329.
- Tull J. C and P. F. Brussard. 2006. Fluctuating Asymmetry as an Indicator of Environmental Stress From Off-Highway Vehicles. *The Journal of Wildlife Management*, 71: 1944-1948.
- UICN, Red List of Threatened Animals, 2006. Union International for Conservation of Nature. Compiled by World Conservation Monitoring Center Cambridge, UK.
- Vargas Uribe, G. 1998. Notas para la historia ambiental de Zacapu y su región. En *Piel de Tierra. Michoacán, Ciudades y Regiones, su Entorno, Historia y Cultura. Nuestro Hábitat*. *Revista del Instituto Michoacano de Cultura*, 9: 9-17.

- Warner, S. C., Dunson, W. A. & Travis, J. 1991. Interaction of pH, density, and priority effects on the survivorship and growth of two species of hylid tadpoles. *Oecologia*, 88: 331–339.
- Westin, D. T. 1974. Nitrate and nitrite toxicity to salmonid fishes. *Progressive Fish-Culturist*, 36: 86–89.
- Whiles M. R., J.B. Jensen, J.G. Palis and Dyer W.G. 2004. Diets of Larval Flatwoods Salamanders, *Ambystoma cingulatum*, from Florida and South Carolina. *Journal Herpetology*, 38: 208-214.
- Whitaker, B. R. 200. Water quality. In *Amphibian medicine and captive husbandry*. Malabar, FL: Krieger Publishing. pp147–157.
- Wright, A. N., and K. R. Zamudio. 2002. Color pattern asymmetry as a correlate of habitat disturbance in spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Journal of Herpetology*, 36: 129–133.

Apéndice I. Parámetros físico-químicos determinados

TEMPERATURA DEL AGUA

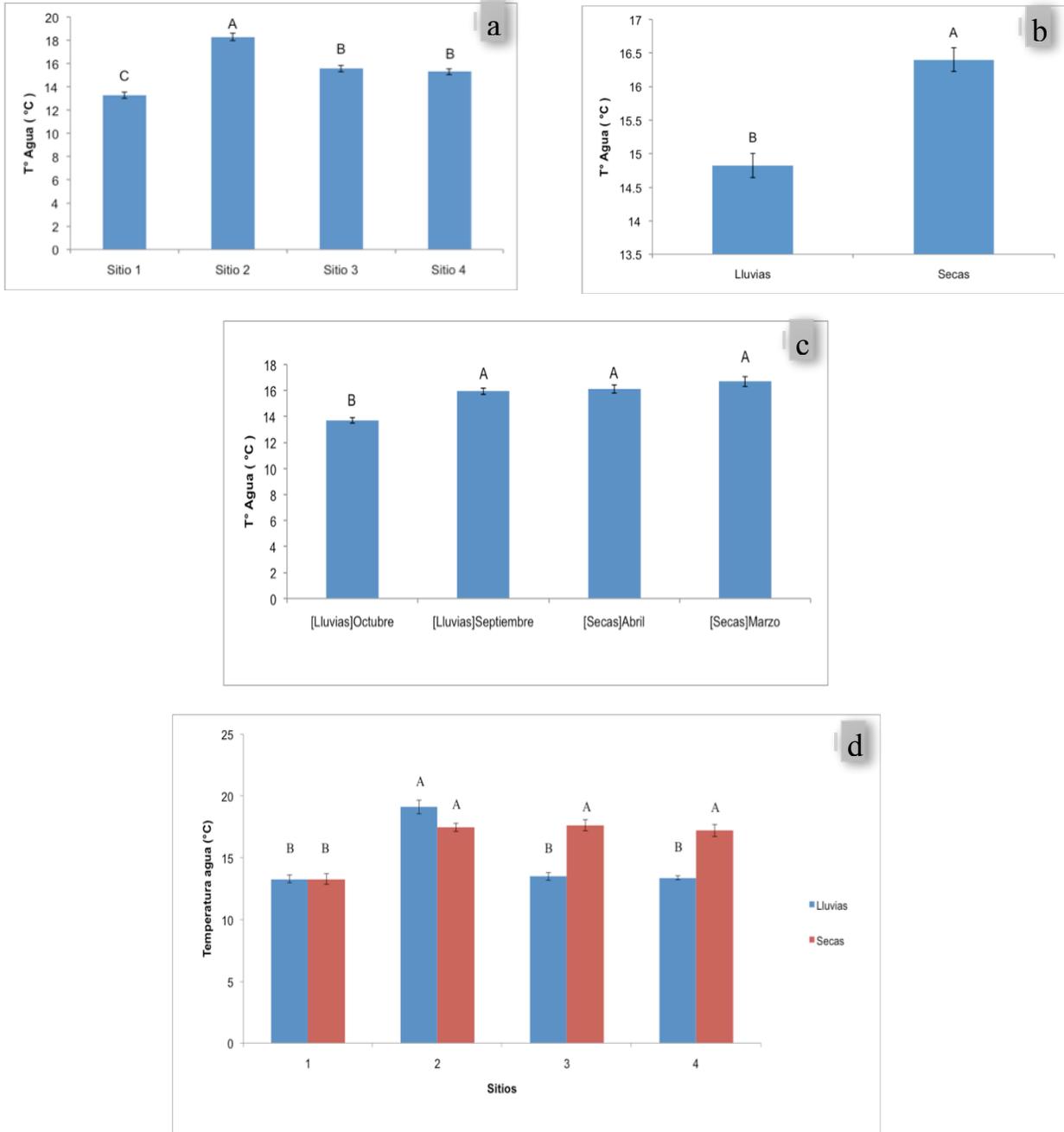


Figura 10. Temperatura del agua por: **a** sitios ($F=60.88$, $g.l.= 3$, $p<0.0001$), **b** temporada ($F=39.46$, $g.l. 1$, $p<0.0001$), **c** mes anidado dentro de temporada ($F=36.09$, $g.l. 2$, $p < 0.0001$), **d** interacción sitio por temporada ($F=17.42$, $g.l. 3$, $p<0.0001$). Letras diferentes sobre cada barra representan diferencias significativas $p>0.05$.

OXÍGENO DISUELTTO

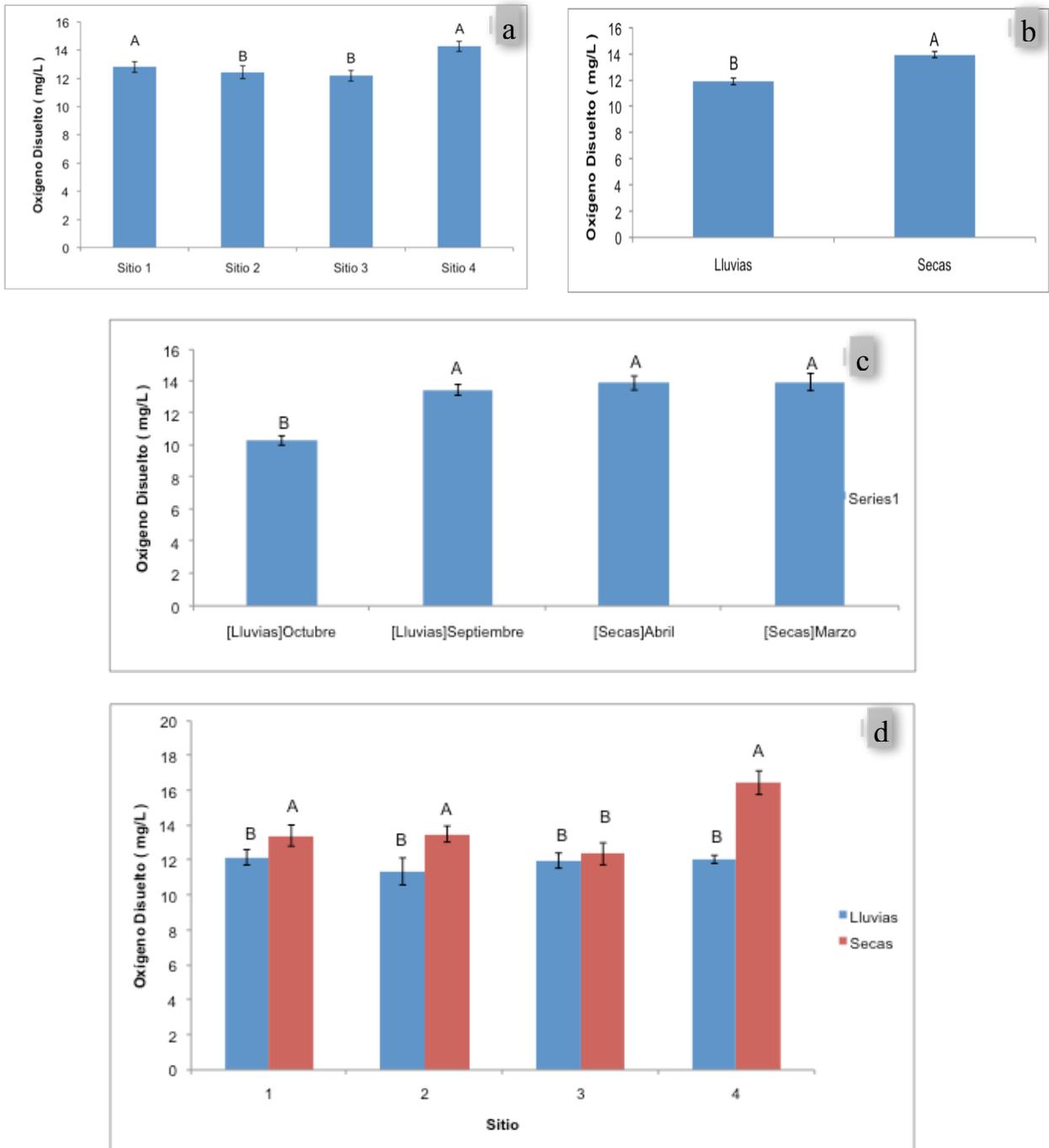


Figura 11. mg de oxígeno disuelto por litro de agua: **a** sitios ($F=6.34$, *g.l.* 3, $p=0.001$), **b** temporada ($F=33.47$, *g.l.* 1, $p<0.0001$), **c** mes anidado dentro de temporada ($F=36.13$, *g.l.* 2, $p < 0.0001$), **d** interacción sitio por temporada ($F=6.85$, *g.l.* 3, $p=0.0018$). Letras diferentes sobre cada barra representan diferencias significativas $p>0.05$.

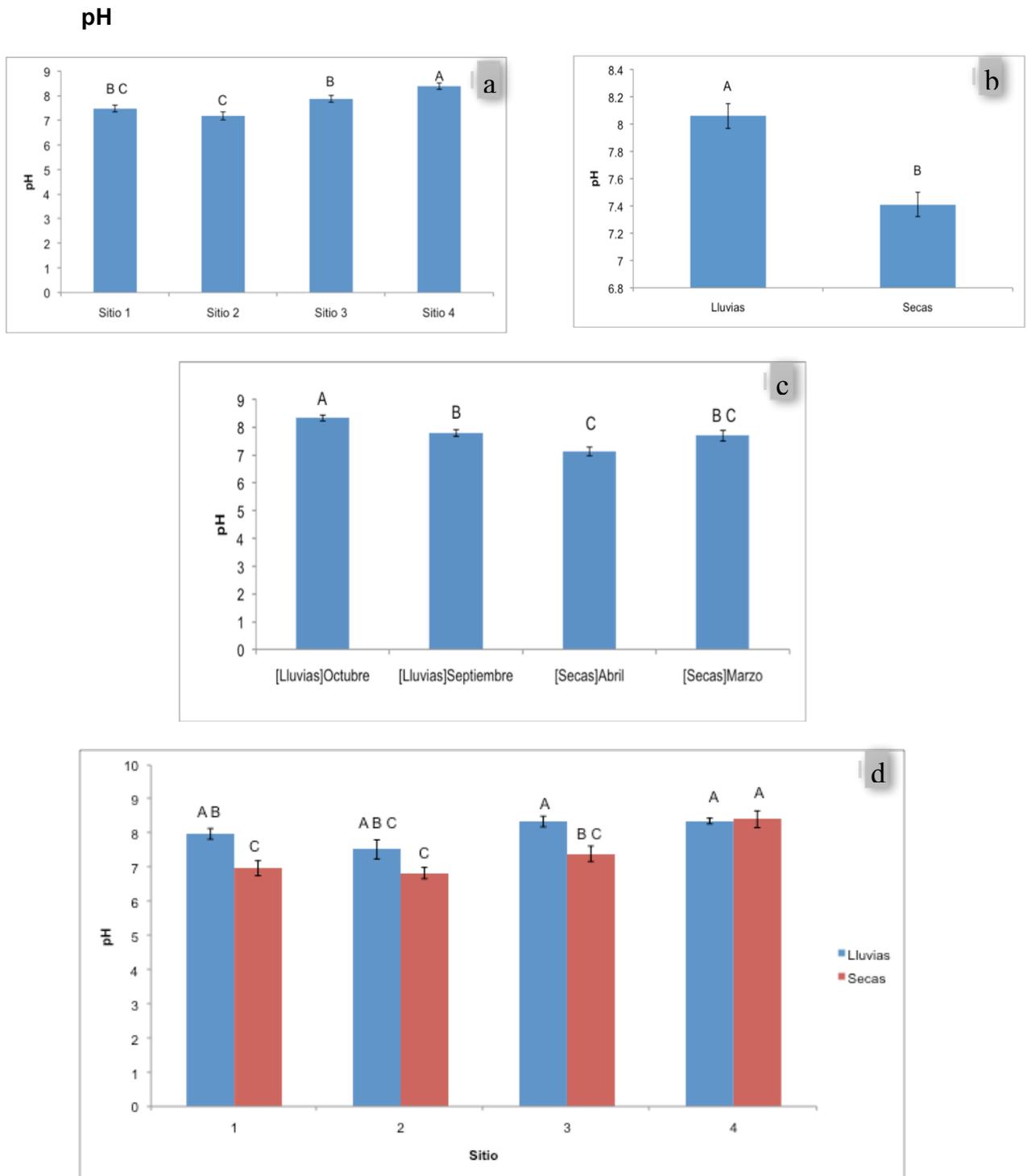


Figura 12. Potencial hidrógeno: **a** sitios ($F=9.6644$, *g.l.* 3, $p<0.0001$), **b** temporada ($F=25.87$, *g.l.* 1, $p<0.0001$), **c** mes anidado dentro de temporada ($F=9.7348$, *g.l.* 2, $p=0.0003$), **d** interacción sitio por temporada ($F=3.15$, *g.l.* 3, $p=0.0323$). Letras diferentes sobre cada barra representan diferencias significativas $p>0.05$.

NITRITOS

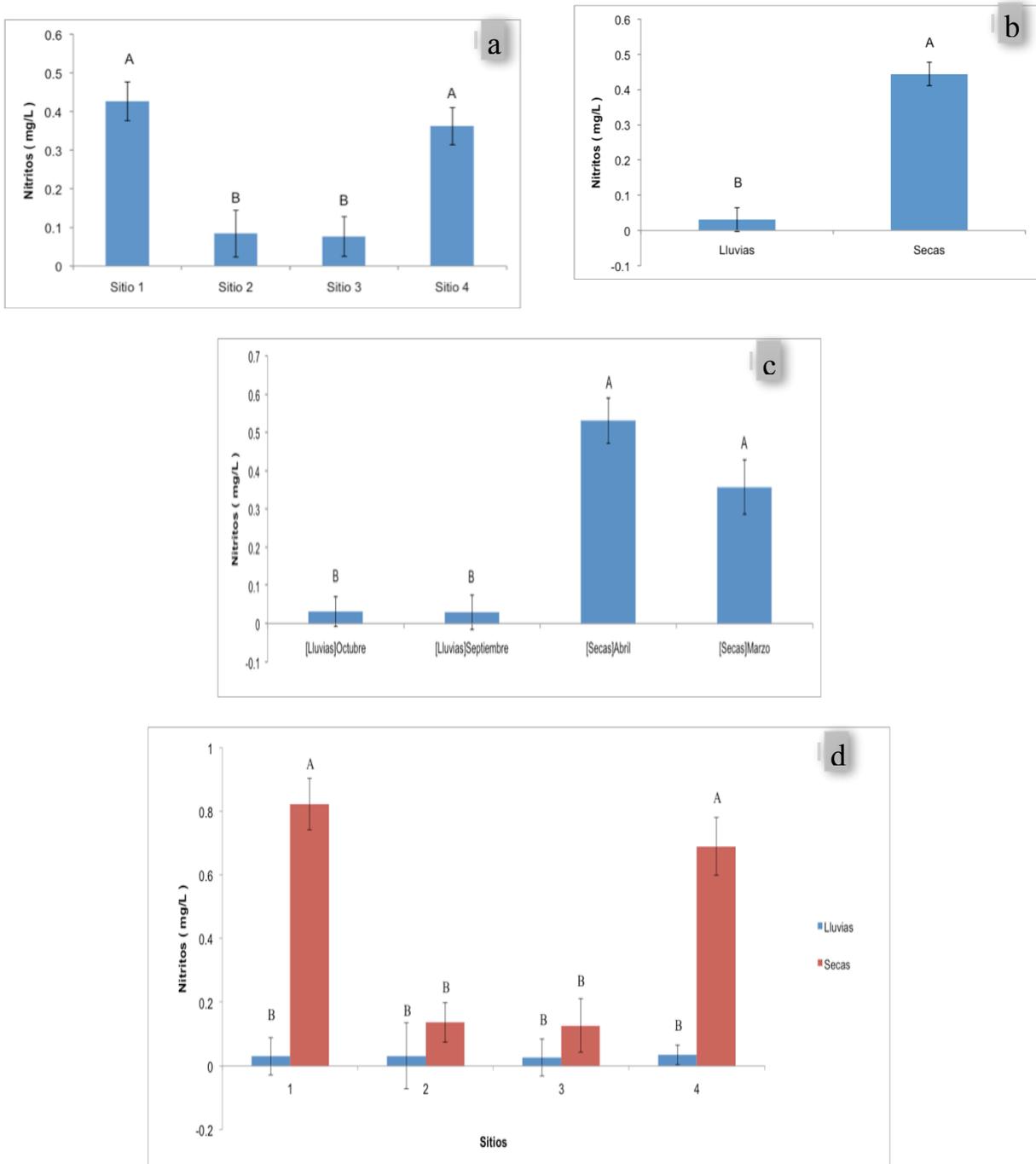


Figura 13. Medias de mg de nitritos/L de agua por: **a** sitios ($F=15.21$, *g.l.* 3, $p<0.0001$), **b** temporada ($F=76.42$, *g.l.* 1, $p<0.0001$), **c** mes anidado dentro de temporada ($F=1.18$, *g.l.* 2, $p=0.3147$), **d** interacción sitio por temporada ($F=14.93$, *g.l.* 3, $p<0.0001$). Letras diferentes sobre cada barra representan diferencias significativas $p>0.05$.

COLORO LIBRE

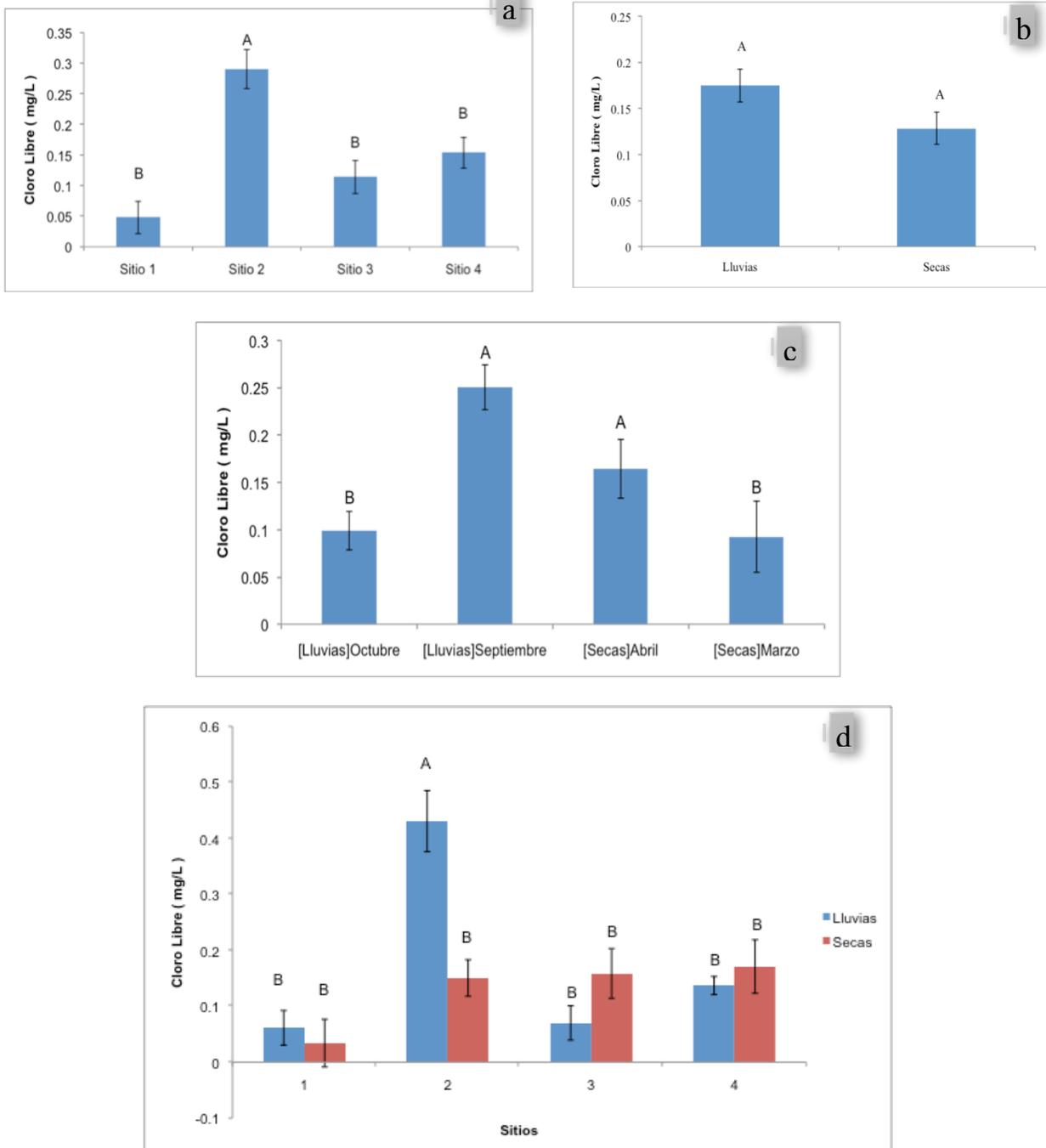


Figura 14. Medias de mg de cloro libre/L de agua: **a** sitios ($F=14.82$, *g.l.* 3, $p<0.0001$), **b** temporada ($F=3.44$, *g.l.* 1, $p=0.069$, .), **c** mes anidado dentro de temporada ($F=17.38$, *g.l.* 2, $p<0.0001$), **d** interacción sitio por temporada ($F=6.85$, *g.l.* 3, $p=0.0006$). Letras diferentes sobre cada barra representan diferencias significativas $p>0.05$.

TRANSPARENCIA

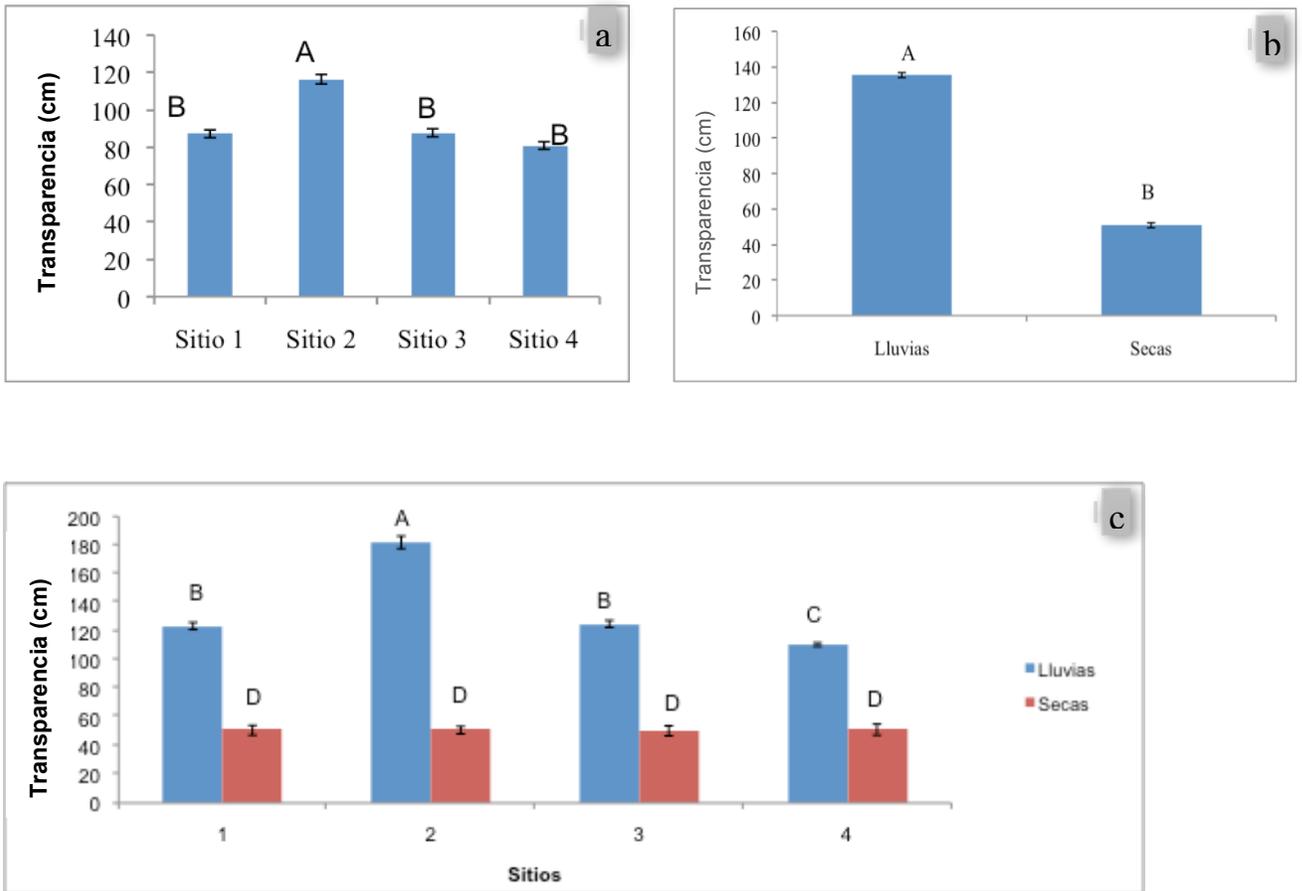
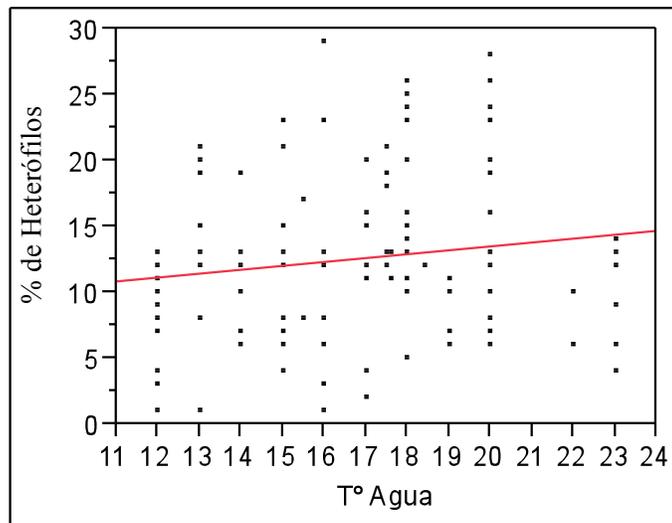
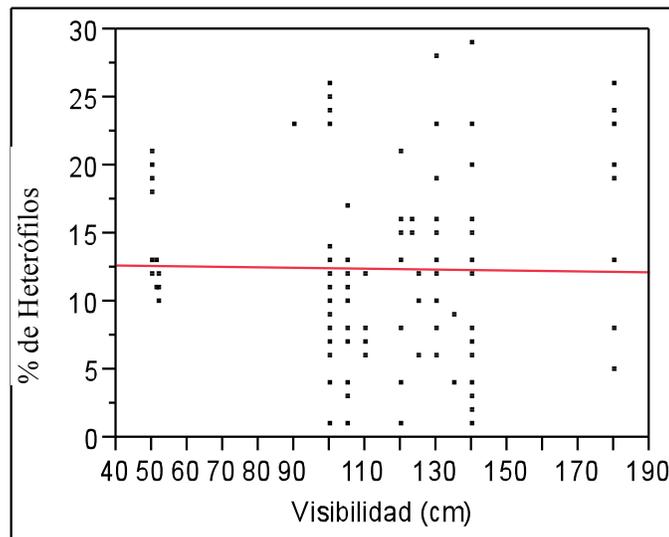


Figura 15. Medias de mg de cloro libre por litro de agua por: **a** sitios ($F=44.03$, *g.l.* 3, $p<0.0001$), **b** temporada ($F=1788.75$, *g.l.* 1, $p<0.0001$), **c** mes anidado dentro de temporada ($F=1.72$, *g.l.* 2, $p=0.189$), **d** interacción sitio por temporada ($F=44.43$, *g.l.* 3, $p<0.0001$). Letras diferentes sobre cada barra representan diferencias significativas $p>0.05$.

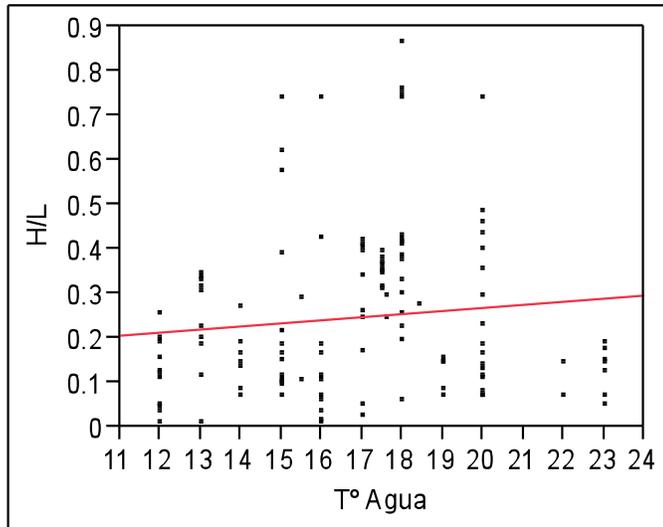
Apéndice II. Correlaciones no significativas.



Regresión lineal simple, eje de las x temperatura del agua, y porcentaje de heterófilos. %Heter = $7.5424264 + 0.2950036 \cdot T^\circ \text{ Agua}$, $p=0.1120$.



Regresión lineal simple, eje de las x transparencia, y porcentaje de heterófilos. %Heter = $12.822546 - 0.0030776 \cdot \text{Transparencia (cm)}$, $p=0.8467$.



Regresión lineal simple, eje de las x temperatura del agua, y índice H/L. $H/L = 0.131174 + 0.0068381 \cdot T^\circ \text{ Agua}$. $p=0.2180$. $p=0.2180$.