



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

“EFECTOS EN EL DESARROLLO Y SUPERVIVENCIA DE
EMBRIONES Y LARVAS RECIÉN ECLOSIONADAS DE
Ambystoma mexicanum POR EXPOSICIÓN A DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE NITRITO, NITRATO Y AMONIO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

CINTHYA MENDOZA ALMERALLA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GABRIELA PARRA OLEA

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM

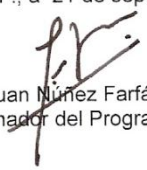
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de junio de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **MENDOZA ALMERALLA CINTHYA** con número de cuenta **98228120** con la tesis titulada **"Efectos en el desarrollo y supervivencia de embriones y larvas recién eclosionadas de *Ambystoma mexicanum* por exposición a diferentes concentraciones de nitrito, nitrato y amonio"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. GABRIELA PARRA OLEA**:

Presidente: DRA. MA. DEL CARMEN URIBE ARANZABAL
Vocal: DR. JAIME ZUÑIGA VEGA
Secretario: DRA. GABRIELA PARRA OLEA
Suplente: DR. LUIS ZAMBRANO GONZALEZ
Suplente: DR. AURELIO RAMIREZ BAUTISTA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de septiembre de 2009.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.
Edif. de Posgrado P. B. (Costado Sur de la Torre II de Humanidades) Ciudad Universitaria C.P. 04510 México, D.F.
Tel. 5623-0173 Fax: 5623-0172 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx>

AGRADECIMIENTOS

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas** de la **UNAM**, por permitirme realizar el presente proyecto y con ello obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas. Igualmente por el apoyo económico brindado para la presentación del trabajo en un congreso y en una estancia internacional.

De forma especial al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt)** por el apoyo económico brindado para realizar la maestría.

A los miembros del Comité Tutorial

Dra. Gabriela Parra Olea

Dra. María del Carmen Uribe Aranzábal

Dr. Aurelio Ramírez Bautista.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Gabriela Parra, por la confianza y apoyo para realizar este proyecto, además de que gracias a sus recomendaciones académicas soy una mejor profesionista.

A la Dra. María del Carmen y al Dr. Aurelio, ya que siempre hicieron aportaciones y críticas para enriquecer el escrito de tesis, además de siempre se mostraron dispuestos a colaborar en todos los tramites requeridos.

En forma especial al Dr. Luis Zambrano, ya que la reproducción de *Ambystoma mexicanum* se llevo a cabo en su laboratorio; además de que las contribuciones y recomendaciones que me hizo como miembro del jurado del proyecto ayudaron a la mejor presentación del escrito. También quiero agradecer a su equipo de trabajo: Lupita y Hugo Cortes debido a que siempre se mostraron dispuestos a ayudarme en la obtención de huevos de la especie.

Al Dr. Jaime Zuñiga, por el apoyo brindado en la realización de los análisis estadísticos de mi tesis.

A mis compañeros y amigos Rodrigo Macip y Saúl López Alcaide por la ayuda y recomendaciones estadísticas para el presente trabajo.

Al Dr. Andrew Blaustein, que aunque breve, nunca podre olvidar la magnifica estancia en su laboratorio, además de que el y su equipo de trabajo hicieron correcciones a este proyecto.

DEDICATORIA

A MIS PADRES FRANCISCO MENDOZA Y ESTELA ALMERALLA.

PAPA PACO “GRACIAS POR TUS ANIMOS Y RECOMENDACIONES EN MI VIDA ACADÉMICA”

A toda la familia Almeralla Narvaez, incluyendo a los abuelos Juan Almeralla y Celia Narvaez.

A mi Bupi por la gran compañía y alegría durante estos 10 años.

A mis amigos de mucho tiempo, los cuales están muy cerca de mi “de veras muchas gracias”.

Por orden de aparición: Norma Martínez Díaz, Oscar Barroso Méndez, Carlos Cruz Dominguez, Asael Najera Carpio, Lizeth Serna Navarrete y Oscar Garrido.

A mis otros amigos especiales

Jorge Calónico, Saúl López, Sandro Esteban, Roberto (tío), Edward y Roberto (oso).

A mis amigos y compañeros del Instituto de Biología:

Margot, Pati Frías, Alan, Daniel, Juan Carlos Windfield, Edna Gonzales, Sandra y Martín.

A mis grandes compañeros de trabajo en el colegio

Lupita López Franco, Marco Antonio Zapien, Jaime y a todos los profesores del colegio que se han portado muy bien conmigo.

A mis amigos Jesus, San Jose y San Charbel

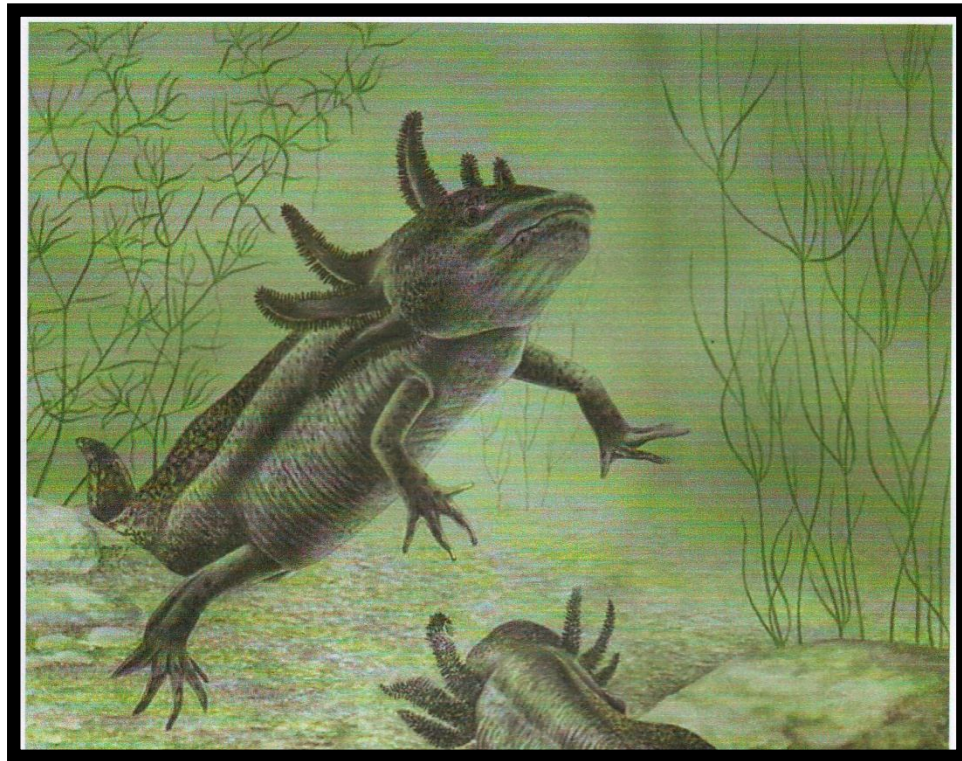
“Desde un primer momento comprendí que estábamos vinculados, que algo infinito perdido y distante seguía sin embargo uniéndonos”

“Fue su quietud lo que me hizo inclinarme fascinado la primera vez que vi los axolotl”

“Su mirada ciega, el diminuto disco de oro inexpresivo y sin embargo terriblemente lucido me penetraba como un mensaje <Sálvanos, sálvanos>”

“Me sentía innoble ante ellos había una pureza espantosa en esos ojos transparentes.....”

FRAGMENTOS DEL CUENTO **AXOLOTL** DE JULIO CORTÁZAR.



Dibujo de *Ambystoma mexicanum*. Realizado por Elvia Esparza.

INDICE

	Página
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	7
OBJETIVOS.....	13
MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	36
LITERATURA CITADA.....	37
APENDICE 1 (Apareamiento y desarrollo embrionario de <i>A. mexicanum</i>).....	42
APENDICE 2 (Fotografías de las malformaciones observadas).....	49
APENDICE 3 (Fotografías del desarrollo incompleto en embriones).....	53
APENDICE 4 (Valores de longitud de los organismos recién eclosionados).....	54
APENDICE 5 (Datos utilizados en los análisis estadísticos).....	61

RELACIÓN DE FIGURAS

Página(s)

Figura 1. Dibujo de la larva de <i>Ambystoma mexicanum</i>	9
Figura 2. Plano de localización de los canales de Xochimilco.....	10
Figura 3. Gráfica del porcentaje de la presencia de curvamiento de espina dorsal.....	22
Figura 4. Gráfica del porcentaje de desarrollo incompleto en cada experimento.	23
Figura 5. Gráfica de valores de longitud para los cuatro lotes experimentales.....	25
Figura 6. Gráfica de la oscilación de los valores de longitud para los cuatro lotes experimentales.....	26
Figura 7. Gráfica del porcentaje de la supervivencia en cada experimento.....	27
Figura 8. Gráfica de los valores de supervivencia para los cuatro lotes experimentales.....	28
Figura 9. Gráfica de la oscilación entre los valores de supervivencia.	29
Figura 10- 15. Imágenes de las etapas de desarrollo embrionario de <i>Ambystoma mexicanum</i>	43
Figura 16-22 Fotografías de las malformaciones en embriones y larvas de <i>A. mexicanum</i>	49
Figuras 23 y 24. Fotografías de desarrollo incompleto en embriones de <i>A. mexicanum</i>	53

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones (mg/l) de amonio y nitrito en los canales de Xochimilco.....	12
Tabla 2. Concentraciones de reactivos utilizados para los diferentes experimentos.....	14
Tabla 3. Valores de frecuencia de supervivencia, mortalidad y malformaciones.	19
Tabla 4. Promedio y desviación estándar de los datos de la longitud hocico-cola de los organismos recién eclosionados en cada experimento.....	24
Tabla 5-11. Datos de longitud de los organismos eclosionados.....	54
Tabla 12. Datos utilizados en los análisis estadísticos.....	61

RESUMEN

Investigaciones a nivel mundial han señalado que el declive poblacional de anfibios es causado por varios factores entre los que se encuentra la contaminación química. En México, existen pocos estudios sobre el efecto de la contaminación en el desarrollo y la supervivencia de los anfibios. Los objetivos del presente estudio fueron identificar y analizar el efecto de diferentes concentraciones de compuestos nitrogenados (amonio, nitrito y nitrato), en un medio artificial, en el desarrollo del ajolote *Ambystoma mexicanum*. Este efecto se evaluó en función de las malformaciones, del desarrollo incompleto, y del tamaño corporal pequeño, así como de la mortalidad.

Los resultados obtenidos demuestran que los individuos de *A. mexicanum* presentaron desarrollo incompleto y edemas en los estadios 0 al 43 (estadios embrionarios), curvamiento de cola y espina dorsal y ausencia de cola en el estadio 44 (organismos recién eclosionados). De éstos efectos, solo el desarrollo incompleto y el curvamiento de cola y espina dorsal tuvieron una frecuencia estadísticamente significativa.

Se comprobó que las concentraciones de los compuestos nitrogenados utilizadas no afectaron el crecimiento de los organismos en el estadio 44, es decir que los organismos que sobreviven no son significativamente de menor tamaño que los del lote control. Con respecto a la toxicidad de los contaminantes se concluyó que el compuesto nitrogenado que afectó más a la supervivencia y desarrollo de *A. mexicanum* fue el amonio, seguido del nitrito y nitrato, y que a partir de una concentración de 0.20 mg/l de amonio, 0.25mg/l de nitrito y de 4 mg/l de nitrato, la supervivencia de los organismos disminuyó más de 80%.

ABSTRACT

Several investigations worldwide indicate that amphibian declines are caused by several factors, one of them being chemical pollution. In Mexico very little has been done in this area of research. The main objectives of this work were to identify and analyze the effect that water pollution in the form of ammonium, nitrite and nitrate (in different concentrations) has on the development of *Ambystoma mexicanum*. The effect of these pollutants was evaluated in terms of the morphological malformations, incomplete development, size at hatching and mortality.

The results showed that individuals of *Ambystoma mexicanum* showed incomplete development and edema in stages 0 to 43 (embryonic stages), curling of the tail and spine, and absence of tail at stage 44 (newly hatched organisms). Of these effects, only the incomplete development and curling tail and spine had a statistically significant frequency.

Results also show that size at hatching is not affected by these chemicals, so those embryos that hatched were not significantly smaller than those from control experiments. With regard to the toxicity of compounds, ammonium was the chemical that affected the most the survival and development of *A. mexicanum*, followed by nitrate and nitrite. Survival of organisms decreased in more than 80% when exposed to concentrations of 0.20 mg / l of ammonia, 0.25mg / l of nitrite and 4 mg / l of nitrate.

INTRODUCCIÓN

A principios de la década de los ochentas, científicos de diversas partes del mundo notaron una disminución y extinción de algunas poblaciones de anfibios (Storfer, 2003). Fue en el año de 1989 durante el primer congreso mundial de herpetología, donde se presentaron datos oficiales de disminuciones drásticas de anfibios en varias localidades del mundo, lo cual sugería la posibilidad de un patrón global; sin embargo, las causas y mecanismos que provocaban este fenómeno eran desconocidas (Collins y Storfer, 2003).

Los factores que se han identificado como causantes del declive de los anfibios del mundo, son de diferente índole como: 1) la alteración, destrucción y fragmentación del hábitat, 2) la introducción de especies exóticas, 3) la sobreexplotación, 4) las enfermedades infecciosas, 5) el cambio climático global, 6) la contaminación química, 7) la radiación UV-B, 8) las malformaciones y los posibles sinergismos entre múltiples factores (Blaustein y Johnson, 2003a; Carey y Alexander, 2003; Collins y Storfer, 2003 y Daszak *et al.*, 2003).

1) La alteración, destrucción y fragmentación del hábitat son los factores más obvios que contribuyen a la declinación de estos organismos (Blaustein y Kiesecker, 2002; Ramírez-Bautista *et al.*, 2009). Esto se debe a que los anfibios son altamente sensibles a los cambios de temperatura y humedad provocados por la alteración en la vegetación. Petranka *et al.* (1993), evaluaron el impacto de la destrucción del hábitat en poblaciones de salamandras; encontrando una menor riqueza y abundancia en 6 claros de los Montes Apalaches.

2) La introducción de especies exóticas tiene un impacto fuerte en las poblaciones naturales de anfibios, ya que éstas compiten por alimento, introducen enfermedades o depredan a los anfibios de la región. Un ejemplo de esto lo reportan Bradford *et al.* (1994) para la Sierra Nevada de California en los Estados Unidos, en donde las poblaciones de *Rana muscosa* declinaron o desaparecieron en corto tiempo (10 años) después de la introducción de peces del género *Oncorhynchus*.

3) El efecto de la sobreexplotación de anfibios para uso doméstico, alimentario y medicinal es poco conocido, pero se infiere que puede ser significativo (Collins y Storfer, 2003). Por ejemplo, Huacuz (2002) reportó una captura inmoderada de la especie *Ambystoma dumerilii*, provocada por la gran

demanda comercial de la especie. Huacuz reporta una captura de casi 200,000 organismos entre 1987 y el año 2000, lo cual ha causado una disminución poblacional drástica de la especie de una densidad de 1.1 org/ ha a la que se encontró en el año 2000 la cual fue de tan solo 0.006 org/ ha.

4) Existen elementos bióticos, como virus, bacterias, parásitos, protozoarios, oomicetes y hongos, que provocan enfermedades, mortalidad y daño subletal en los anfibios (Blaustein y Kiesecker, 2002). Actualmente se les considera a estas enfermedades infecciosas como una causa directa de la declinación de algunas poblaciones de anfibios, debido a que estos padecimientos infecciosos pueden aparecer súbitamente en la población, incrementando rápidamente su incidencia y virulencia en un amplio rango geográfico (Carey y Alexander, 2003). Un ejemplo es la quitridiomycosis, enfermedad ocasionada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, que ha sido encontrado en casi todo el mundo (Australia, Europa, Centro y Norteamérica), y se ha comprobado que ha causado declive de muchas especies de anfibios (Collins y Storfer, 2003 y Daszak *et al.*, 2003).

5) El cambio climático global ha ocasionado la modificación de los patrones de precipitación y temperatura, lo cual afecta la reproducción y fenología de algunas poblaciones de anfibios (Pounds *et al.*, 1999; Blaustein y Kiesecker, 2002 y Carey y Alexander, 2003). Existen varios estudios donde se ha detectado la correlación entre factores climáticos y declinación de anfibios. Un ejemplo de esto es el caso de *Eleutherodactylus coqui* y otras especies de Puerto Rico, que tuvieron un declive dramático en 1983 correlacionada con el incremento en el número de días con menos de 3 mm de precipitación media anual (Stewart, 1995).

6) Se ha observado que la contaminación química puede causar mortalidad en los anfibios, ya que afecta su conducta, reduce sus tasas de crecimiento o induce inmunosupresión (Alford y Richard, 1999; Blaustein y Kiesecker, 2002). La amplia variedad de contaminantes que afectan las poblaciones de los anfibios se puede resumir en pesticidas (muchos de ellos han sido confeccionados a base de nitrógeno), fungicidas, herbicidas y metales pesados (Blaustein *et al.*, 2003). Recientemente se han registrado varios casos de declinación a causa de contaminación; por ejemplo, Kirk (1998) documentó que el DDT rociado en algunos bosques de Oregón podría haber ocasionado mortalidad en una población de *Rana pretiosa*.

7) En los últimos años la radiación solar que llega a la superficie terrestre se ha incrementado debido a la disminución de la capa de ozono. Esta radiación está dividida en varios espectros de luz (infrarroja, blanca y ultravioleta), los cuales se definen por su longitud de onda, medida en nanómetros

(nm). La radiación que causa mayor daño es la ultravioleta (UV) que se clasifica en tres tipos, UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) y UV-C (200-280 nm). Se ha observado que de los tres tipos, la radiación UV-B es la que ocasiona más daño a los anfibios, ya que provoca problemas como: una tasa lenta de crecimiento, muerte celular, mutaciones y disfunción del sistema inmune, los cuales a su vez resultan en la presencia de malformaciones e incremento de mortalidad de embriones (Blaustein *et al.*, 2003). Blaustein *et al.* (2003) reportaron una baja frecuencia de eclosión en la salamandra *Ambystoma macrodactylum* (14.5%) cuando los embriones se someten a radiación UV-B. Los autores también han reportado que el incremento en la radiación UV-B ha afectado a más de 40 especies de anfibios (ranas y salamandras).

8) El tema de las malformaciones en anfibios es complejo porque está asociado con la calidad del agua, fisiología, desarrollo, ecología y anatomía de estos organismos, esto último debido a que la piel de estos organismos es lisa y permeable, además de que sus huevos sólo están cubiertos por envolturas gelatinosas, lo que podría hacerlos más susceptibles a contaminantes químicos y así ocasionarles anomalías (Casas-Andreu y Aguilar-Miguel, 1997). En la última década ha existido un incremento en la aparición de malformaciones en anfibios, tanto que en más de 60 especies se han observado estas anomalías (Blaustein y Johnson, 2003) y en algunos casos hasta un 80% de los individuos ha exhibido algún tipo de malformación (Blaustein *et al.*, 2003). De acuerdo con Blaustein y Johnson (2003 a y b), los anfibios que sufren malformaciones tienen desventajas, ya que no pueden escapar de sus depredadores, y tampoco se alimentan de manera eficiente, lo cual podría llevar a toda una población a la extinción.

Recientemente diversos trabajos han reportado la existencia de un factor causante de malformaciones en anfibios que no había sido tomado en cuenta. Ésta es la contaminación del ambiente por nitrógeno en forma de amonio, nitrato y nitrito (Marco *et al.*, 1999; Schuyttema y Nebeker, 1999; Ortiz *et al.*, 2004 y Romansic *et al.*, 2006). Aunque es cierto que el nitrógeno se encuentra en los cuerpos de agua de manera natural, éste elemento tiene distintos orígenes. Por ejemplo, el nitrógeno amoniacal que existe en aguas profundas generado por la reacción que producen las bacterias autótrofas al reducir los nitratos (NO_3) a amonio, por otro lado los animales muertos al degradarse producen nitrógeno amoniacal (Blanco, 1995). Sin embargo un exceso de amonio, nitrato o nitrito puede provenir también por el uso indiscriminado de insecticidas y fertilizantes además del vertimiento de basura orgánica e inorgánica (De la Rosa, 2006).

Lo cuerpos de agua en areas urbanas son especialmente susceptibles a acumular contaminantes de diversas fuentes. Por ejemplo en el Lago de Xochimilco los habitantes 1) han vertido sus aguas residuales a los canales,2) han usado fertilizantes (la mayoría hechos a base de nitrógeno) para el cultivo en las chinampas sin una asesoría adecuada y 3) han propiciado una alta concentración de materia orgánica en descomposición; por el cultivo de especies no nativas como el lirio acuático *Eichhornia crassipes* y los peces *Oerochromis niloticus* y *Cyprinus carpio* (De la Rosa, 2006).

Los organismos de *A. mexicanum* habitando su medio natural estan siendo expuestos a una alta contaminación de nitrógeno (Zambrano *et al.* 2007). Estudios recientes señalan que ademas de la contaminación del lago de Xochimilco, la reducción del Lago y a la presencia de especies invasoras ha contribuido a que actualmente la población este reducida a 0.0012 organismos por metro cuadrado, con la posibilidad de extinguirse en 15 años.

El presente trabajo tiene como objetivo principal determinar el daño que provocan ciertas concentraciones de compuestos nitrogenados a la supervivencia y desarrollo de organismos de el ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) en los primeros estadios de vida.

ANTECEDENTES

Efectos de la contaminación por nitrógeno en anfibios

La toxicidad del nitrógeno es debida a que los nitratos se convierten en nitritos y éstos oxidan el hierro de la hemoglobina convirtiendo a ésta en methemoglobina, la cual tiene muy poca afinidad por la molécula de oxígeno y por tanto, disminuye su transporte en los vasos sanguíneos (Ryczel, 2006). Asimismo, se ha documentado que el nitrógeno en grandes cantidades es cancerígeno y una vez que éste entra en el cuerpo puede permanecer en los pulmones, exhalarse o moverse en la sangre, sistema digestivo o piel (INFRA, 2007).

El efecto por exposición a compuestos nitrogenados en embriones y larvas de anfibios ha sido documentado para varias especies (Buttner y Nace, 1984; Marco *et al.*, 1999; Marco y Blaustein, 1999; Schuytema y Nebeker, 1999; Hatch y Blaustein, 2003; Ortiz *et al.*, 2004 y Romansic *et al.*, 2006) y en general los resultados observados han sido: incremento en tasa de mortalidad, decremento en tasa de supervivencia, presencia de diversas malformaciones, desarrollo lento y bajo crecimiento. Por ejemplo, larvas de *Ambystoma gracile* y *Rana pretiosa* expuestas a 25 mg/l de nitrato de potasio tuvieron un porcentaje de supervivencia de tan solo un 50 y 40% respectivamente, presentaron malformaciones como edemas y encorvamientos de cola, redujeron su capacidad para nadar y mostraron desequilibrio y parálisis (Marco *et al.*, 1999). Por otro lado larvas de *Rana pretiosa*, *Anaxyrus boreas*, *Pseudacris regilla* y *Ambystoma gracile* presentaron esas mismas anomalías morfológicas cuando fueron expuestas a 7 mg/l de nitrito de sodio (Marco *et al.*, 1999). Finalmente, larvas de *Rana cascadae* que fueron expuestas a una concentración de 3.5 mg/l, de amonio presentaron desarrollo y absorción de cola de forma lenta (Marco y Blaustein, 1999).

En lo que respecta a los efectos en los embriones, se han registrado diversas anomalías morfológicas. Por ejemplo, cuando se expusieron embriones de *Pleurodeles waltl*, *Discoglossus galganoi*, *Hyla arborea*, *Bufo bufo* y *Bufo calamita* a concentraciones de 50, 100 y 200 mg/l de nitrato de amonio todos los embriones mostraron algún grado de sensibilidad. Por ejemplo, *Pleurodeles waltl* presentó un menor tamaño corporal pero la mortalidad fue baja (menos del 10%) mientras que *H. arborea* sufrió una mortalidad del 95%. Los embriones de *Discoglossus galganoi*, *B. bufo* y *B. calamita* presentaron edemas, doblamiento de cola y curvamiento de espina dorsal “lordosis” (Ortiz *et al.*, 2004). En otro estudio se expusieron embriones de *Pseudacris regilla* y *Xenopus laevis* a diferentes compuestos nitrogenados tales

como: cloruro de amonio, nitrato de amonio, sulfato de amonio y nitrato de sodio. Los resultados mostraron que *P. regilla* expuesta a una concentración máxima 25 mg/l de cloruro de amonio presentó supervivencia de 76.7%; sin embargo, el 17% de los organismos sobrevivientes presentaron lordosis (curvamiento de espina dorsal). Por otro lado *X. laevis* mostro supervivencia de 76.7% con una concentración de casi 50mg/l de cloruro de amonio y el 25 % de los sobrevivientes presentaron lordosis. Con el nitrato de amonio, *P. regilla* exhibió una supervivencia de 53.3% a una concentración de 25.1 mg/ l, y ningún organismo presentó malformaciones. Mientras que *X. laevis* presentó una supervivencia de 88.3% a la concentración de 25.1 mg/ l, y todos los organismos presentaron lordosis. Con el sulfato de amonio *P. regilla* mostró una supervivencia de 6.7% a la concentración de 45.4 mg/l y el 6 % de los presentaron edemas y lordosis, mientras que *X. laevis* presentó una supervivencia de 80% a una concentración de 23.1mg/ l y todos los organismos exhibieron lordosis. Finalmente, con el nitrato de sodio *P. regilla* tuvo una supervivencia de 36.7% a una concentración de 979.2 mg/l, el 9% de los organismos presentaron edemas y lordosis mientras que *X. laevis* presentó un 60% de supervivencia a una concentración de 470.4 mg/l y el 50 % de los organismos presentaron lordosis (Schuytema y Nebeker, 1999).

Características generales de *Ambystoma mexicanum*

El ajolote mexicano *Ambystoma mexicanum* (Shaw, 1798) es una salamandra que pertenece a la familia Ambystomatidae. Esta familia esta formada por el género *Ambystoma*, el cual se distribuye desde el sur de Canadá y Alaska hasta el Eje Neovolcánico Transversal Mexicano (Matías, 2006 y Huacuz, 2002). En Mexico existen 17 especies del genero *Ambystoma* de los cuales 4 son neotenicos: *A. mexicanum* (Figura 1), *A. andersoni*, *A. dumerilii* y *A. taylori*. El hecho de que estas especies sean neotenicas las hace especialmente susceptibles a los contaminantes presentes en su medio natural ya que pasan su vida entera en forma de larva (Graue, 1998 y Flores *et al.*, 1995).

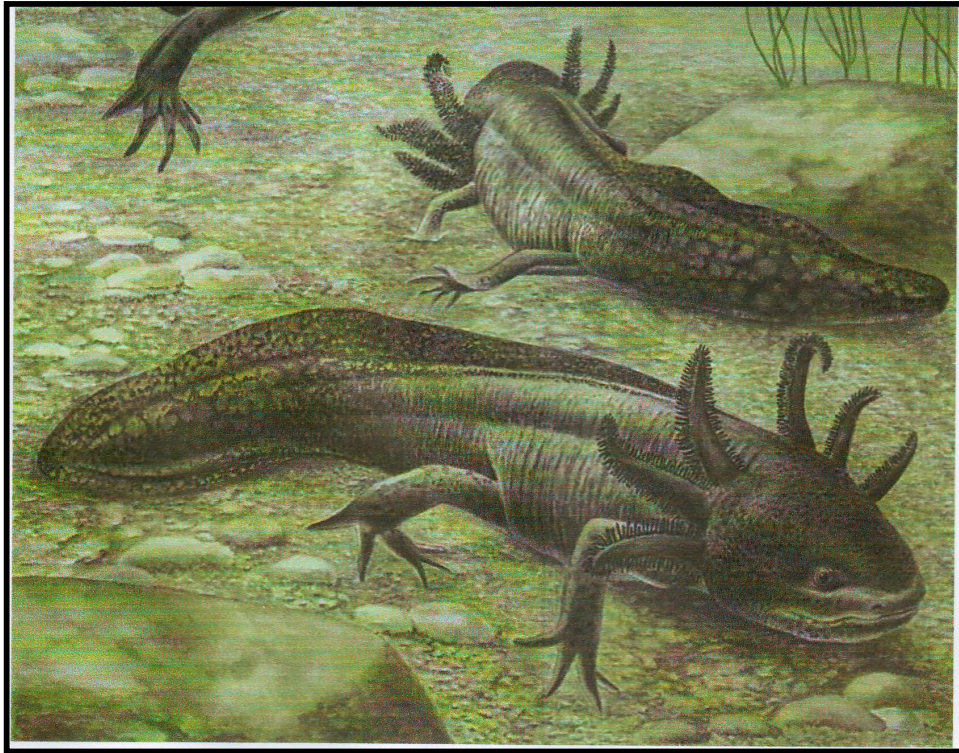


Figura 1. Dibujo de la larva de *Ambystoma mexicanum* realizado por Elvia Esparza.

Los organismos de *A. mexicanum* han sido utilizados en diversas investigaciones debido su relativa facilidad de reproducción, pero sobre todo en el area de biología del desarrollo por su capacidad de regeneración de miembros del cuerpo (Graue, 1998). Por otro lado, *A. mexicanum* es reconocido por su importancia histórica, cultural, económica y ecológica. Desde la época prehispánica hasta la actualidad el ajolote es utilizado como alimento y medicina para el tratamiento de enfermedades de vías respiratorias. Desde un punto de vista ecológico, *A. mexicanum* es una especie que sirve como indicador ambiental por sus características de la piel, lo cual lo hace altamente susceptible a la calidad general del ambiente (Huacuz, 2002 y Blaustein y Wake, 1990).

El hábitat original de *A. mexicanum* se remonta a un lago extenso y somero que durante el Pleistoceno cubría el Valle de México, alimentado principalmente por dos manantiales (Xochimilco y Chalco) (Brandon, 1989). En el siglo XVI la superficie de distribución era de aproximadamente 600 km²; sin embargo, el crecimiento urbano ha ocasionado la desecación y desaparición de casi todo el hábitat de *A. mexicanum*, reduciéndose a solo 180 km², divididos en varios canales en el Lago de Xochimilco (Figura 2) (Roldan y Bojorquez, 1995). *Ambystoma mexicanum* habita en cinco canales: Fernando Celada, Laguna del Toro, El Bordo, Japón y Puente de Urrutia (Zambrano, 2004).

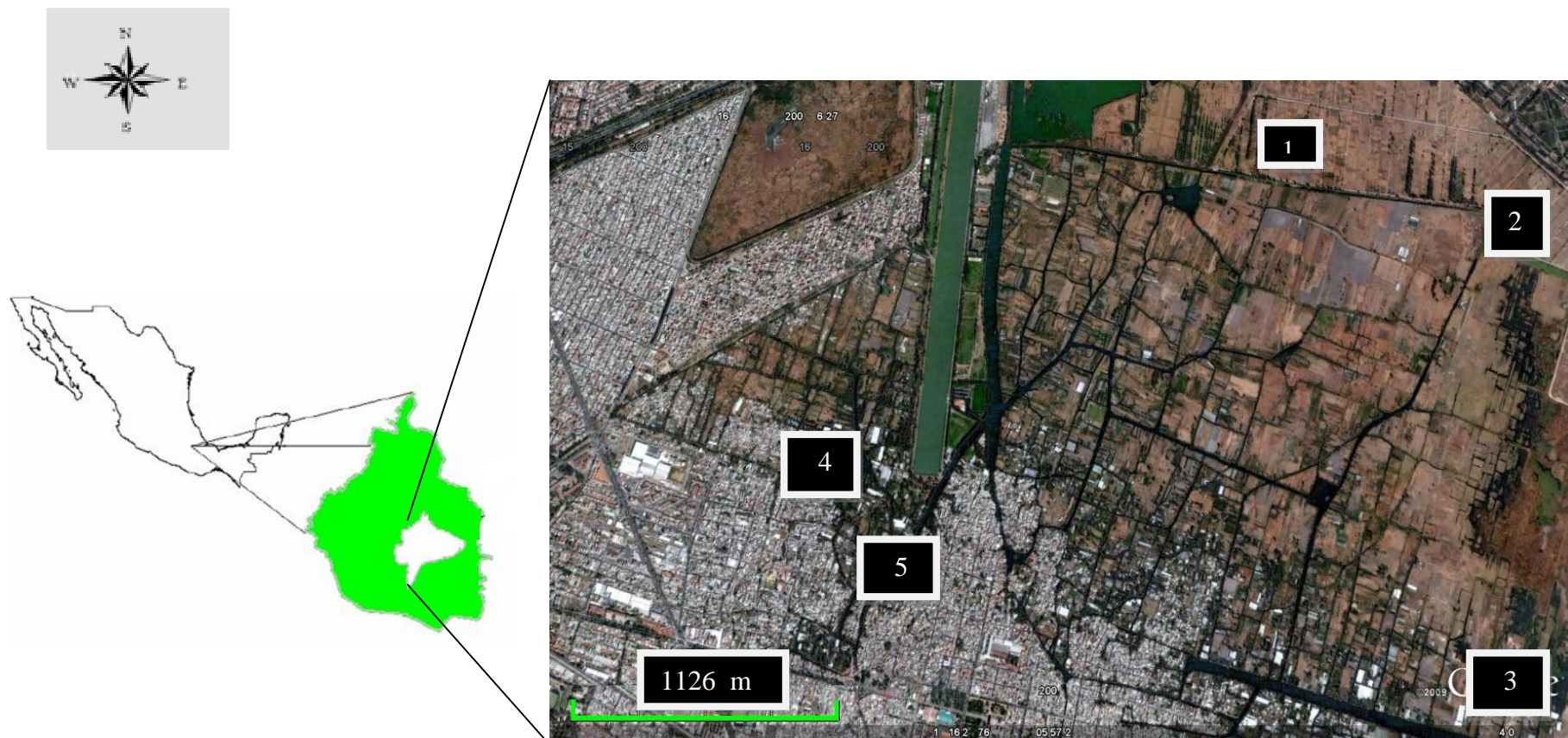


Figura 2. Plano de localización de los canales de Xochimilco en donde se ha encontrado *A. mexicanum*: 1. El bordo; 2. Japón; 3. Puente de Urrutia; 4. Laguna del Toro; 5. Fernando Celada. Tomado de Google (2009).

La zona chinampera de Xochimilco tiene fuertes problemas de contaminación química (Zambrano *et al.* (2007)). Las fuentes de esta contaminación son derivadas primordialmente por una altísima densidad poblacional con un sistema de alcantarillado insuficiente, con un drenaje que no se ha conectado con el sistema general de desagüe por lo que los habitantes vierten sus aguas residuales a los canales. Otra fuente de contaminación también derivada de la sobrepoblación, son los tiraderos de basura orgánica e inorgánica. Finalmente, los agricultores de la zona aplican insecticidas y fertilizantes (los cuales están hechos a principalmente a base de nitrógeno) en los cultivos sin la asesoría adecuada (De la Rosa, 2006 ; UNESCO, 2006 y Zambrano *et al.*, 2009).

Para determinar el grado de contaminación del agua, Contreras (2006) obtuvo los valores físico-químicos incluyendo las concentraciones promedio de los compuestos nitrogenados amonio y nitratos (Tabla 1). La autora señala que la concentración promedio de amonio en Xochimilco es de 1.4 mg/l y el promedio de la concentración de nitratos en el mes de octubre fue de 9.13 mg/l con un pH superior a 7. En lo que respecta a los valores de nitritos González (2006) encontró tres tipos de concentraciones: 0.1, 0.2 y 0.3 mg/l en las zonas de: Puente de Urrutia, Apatlaco, Laguna de la Asunción y la Draga. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-127-SSA1-1994), los valores permisibles de la concentración de compuestos nitrogenados en el agua es alrededor de 0.50 mg/l de nitrógeno amoniacal, 1 mg/l de nitrito y 10 mg/l de nitrato.

Tabla 1. Concentraciones (mg/l) de amonio y nitrito en los canales de Xochimilco. Los canales que están subrayados representan las localidades donde se han colectado algunos individuos de *A. mexicanum*. Datos tomados de Contreras, (2006).

Canal	Promedio de la concentración de amonio mg/l	Promedio de la concentración de nitratos mg/l
<u>Laguna del Toro</u>	0.79	0.57
<u>El Bordo</u>	0.55	4.13
<u>Puente de Urrutia</u>	1.84	9.03
Cuemanco	0.47	10.74
La virgen	1.57	5.78
Infiernito	2.94	8.61
Apampilco	2.01	9.39
Pizocoxpa	2.34	11.44
Belem- Sta Cruz	1.34	35.68
Caltongo- turistico	1.42	16.87
Canal Nacional	1.79	14.89
Toltenco	1.04	0.44
Cuacalco	1.27	0.55
Amelaco	1.32	0.00
Media	1.48	9.15
D.S	0.68	9.40

La importancia cultural, económica, ecológica, el declive de las poblaciones de *A. mexicanum* aunado a la problemática de la contaminación en su hábitat, señalan que es necesario obtener conocimientos que proporcionen herramientas para un adecuado manejo y conservación de la especie. Es por esto que el presente trabajo tiene por objetivo determinar alteraciones en el desarrollo y supervivencia en los primeros estadios de vida de *A. mexicanum* provocados por la exposición a concentraciones de amonio, nitrito y nitrato similares a las observadas en su hábitat el Lago de Xochimilco.

OBJETIVOS

Generales

- Identificar las alteraciones en el desarrollo de *A. mexicanum* en los estadios embrionarios (0 al 43) y en los recién eclosionados (estadio 44) por la exposición a diferentes concentraciones de compuestos nitrogenados (amonio, nitrito y nitrato) en un medio artificial.

Específicos

- Identificar las malformaciones morfológicas presentadas por los embriones y recién eclosionados de *Ambystoma mexicanum* cuando son expuestos a diferentes concentraciones de amonio, nitrito y nitrato.
- Determinar la tasa de desarrollo incompleto en embriones de *Ambystoma mexicanum* cuando son expuestos a diferentes concentraciones de amonio, nitrito y nitrato.
- Determinar la variación en tamaño corporal en eclosionados de *A. mexicanum* después de la exposición a diferentes concentraciones de amonio, nitrito y nitrato.
- Comparar la tasa de supervivencia de embriones de *A. mexicanum* después de la exposición a diferentes concentraciones de amonio, nitrito y nitrato.

MÉTODOS

1.- Obtención de huevos.

Se colocaron organismos reproductores en una proporción de dos machos por una hembra en tinas de aproximadamente 1 metro de diámetro. Los organismos se mantuvieron en las tinas por un periodo máximo de 5 días, en un ambiente de oscuridad total y a una temperatura aproximada de 15 ° C. Cada 24 horas se revisaba la tina para retirar las puestas de huevos y si al cabo de 5 días no había puestas, los organismos se retiraban.

2.- Concentraciones y reactivos utilizados.

La elección de los reactivos utilizados y la metodología utilizada fue establecida siguiendo los estudios de Marco *et al.* (1999), Marco y Blaustein (1999), Romansic *et al.* (2006) y Schuyttema y Nebeker (1999). En lo que respecta a las concentraciones de los compuestos utilizadas, estas se eligieron de manera que incluyera las reportadas en los canales de Xochimilco donde se encuentra la especie. De esta manera se empleo nitrato y nitrito de sodio así como cloruro de amonio en diferentes concentraciones (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de reactivos utilizados para los diferentes experimentos (Exp.) en mg/l

<i>Número de recipientes (experimento más 3 replicas)</i>	<i>Reactivos</i>	<i>Exp. 1</i>	<i>Exp. 2</i>	<i>Exp. 3</i>	<i>Exp. 4</i>	<i>Exp. 5</i>	<i>Exp. 6</i>	<i>Exp. 7</i>
4	amonio	0.1	0.20	0.25	0.3	0.35	0.5	-----
4	nitrito	0.1	0.20	0.25	0.3	0.35	0.5	-----
4	nitratos	0.1	0.3	0.5	2	4	5	7
4	lote testigo	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

3.-Experimentos.

Cada experimento consistió en someter huevos de *Ambystoma mexicanum* a las concentraciones antes mencionadas de amonio, nitrito y nitrato hasta el momento de la eclosión de los mismos. Los experimentos se llevaron a cabo en el cuarto húmedo del Instituto de Biología (UNAM). En total se realizaron 6 experimentos para los compuestos de amonio y nitrito, 7 para el compuesto nitrato, debido a que las concentraciones de este compuesto en el Lago de Xochimilco son más altas que en los otros compuestos, por lo que era necesario agregar un experimento mas para este compuesto . En lo que respecta al lote control, este consto de 7 experimentos en los que solo había huevos fertilizados de *Ambystoma mexicanum* en agua. La diferencia entre este y los otros lotes fue la ausencia de algún compuesto nitrogenado. Es importante mencionar que todos los lotes constaron de 4 réplicas.

Cabe destacar que en el momento del desove, se contó el número de huevos y se tomaron 80 huevos para cada experimento, teniendo entonces 4 recipientes con 20 huevos en cada replica. Los recipientes utilizados tuvieron un diámetro de 13 cm con una profundidad de 20 cm, y con una capacidad de 2 litros, por lo que, cuando se requería tener una concentración de 0.1 mg/l, en cada recipiente se ponía 0.2 mg del compuesto requerido. A partir de la instalación, se cambió el medio (agua + compuesto nitrogenado) de todos los recipientes cada 3 días, con el fin de que las concentraciones de los reactivos no cambiaran por evaporación|. Todos los recipientes tuvieron oxigenación permanente durante cada experimento.

4.- Seguimiento de los experimentos.

Diariamente se observó cada recipiente para registrar el estado de cada organismo. Cuando se encontraban organismos no viables o con alguna malformación se extraían, se observaban bajo el microscopio y se registraba el fenómeno.

5.-Registro de datos

Para facilitar el análisis de resultados, éstos se registraron en dos tipos de formatos para cada experimento. El primero presentó los datos de: tipo de lote experimental , concentración en mg/l de los reactivos, número de organismos en cada replica, número y porcentaje de organismos muertos por ausencia de desarrollo o desarrollo incompleto, número y porcentaje de organismos eclosionados sanos, número y porcentaje de organismos con malformación (en huevo y eclosionado) y tipos de

malformación; mientras que en el segundo formato se registró la longitud total (hocico-cola) en milímetros de los recién eclosionados de cada experimento.

6.- Análisis de resultados.

Los resultados de frecuencia de malformaciones, de desarrollo incompleto, tamaño corporal y tasa de supervivencia se presentan de manera gráfica en forma de porcentaje para todos los lotes experimentales. Para efectuar de manera correcta los análisis estadísticos, se transformaron los datos de frecuencia de supervivencia de cada lote experimental en base a las recomendaciones de Zar (1999). La transformación consistió en obtener el arcoseno de la raíz de cada valor de los lotes experimentales utilizados. Los datos de frecuencia con su transformación se pueden observar en el apéndice V. De la misma manera los datos de tamaño corporal de recién eclosionados fueron transformados al obtener el log del promedio de la longitud de cada lote experimental. Se utilizó el programa Statistica 8.

Malformaciones.

El análisis consistió en determinar que malformaciones presentaban una frecuencia considerada alta (5 % o más) y peligrosa debido a que la población estaría en inminente declinación (Blaustein y Johnson, 2003b).

Desarrollo incompleto.

Se realizaron gráficas en las que se comparó la frecuencia de esta anomalía en el desarrollo entre los lotes de compuestos nitrogenados y los lotes control con el fin de determinar si este fue provocado por la exposición de los embriones a los contaminantes. De la misma manera que las malformaciones morfológicas, se analizó si este fenómeno se presentaba con una frecuencia mayor del 5% para determinar si esta anomalía podría poner en peligro de extinción a la población de *A. mexicanum*.

Variación en tamaño corporal de recién eclosionados

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) anidado para determinar si los compuestos nitrogenados causaban talla menor con respecto a los lotes control. Cabe destacar que el séptimo experimento de nitratos no fue analizado para evitar sesgo en los resultados.). Posteriormente, si se encontraban diferencias significativas se efectuaría un análisis de comparación múltiple (pos hoc) para identificar que concentraciones y que compuestos serían diferentes entre sí en cuanto a las tallas de los organismo. La prueba estadística post hoc utilizada sería la prueba de Tuckey.

Tasa de supervivencia

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) anidado para determinar si los compuestos nitrogenados causaban una alta tasa de mortalidad con respecto a los lotes control.

También se efectuó este análisis para saber si había diferencias significativas en la tasa de supervivencia de todos los lotes en los seis experimentos (el séptimo experimento de nitratos no fue analizado para evitar sesgo en los resultados). Posteriormente, si se encontraban diferencias significativas se efectuaría un análisis de comparación múltiple (pos hoc) para identificar que concentraciones y que compuestos serían diferentes entre sí.

La prueba estadística post hoc utilizada para saber entre que tratamientos y concentraciones había diferencias significativas sería la prueba de Tuckey.

RESULTADOS

Los datos registrados al final de cada experimento, señalan que los compuestos nitrogenados afectaron de varias formas a los embriones de *A. mexicanum*. El primer efecto fue la muerte de los embriones entre el estadio 1 (huevo fertilizado) y el 43. Al hecho de que los embriones no se desarrollarán hasta el estadio 44 (eclosión) se le llamo desarrollo incompleto, debido a que por el evento de muerte, los organismos interrumpieron dicho proceso. Para la realización de las reseñas de los resultados obtenidos en las imágenes que se muestran, se revisaron las descripciones de las etapas del desarrollo embrionario de *A. mexicanum*, las cuales fueron hechas por Armstrong *et al.* (1989) y se encuentran en el apéndice I.

Los porcentajes de supervivencia, desarrollo incompleto y presencia de malformaciones en cada experimento, se presentan en la tabla 3. A cada tratamiento se le dio un nombre que esta compuesto por el del contaminante y un número consecutivo para las diferentes concentraciones. Experimento 1, a una concentración de 0.1mg/l en los tres compuestos nitrogenados (nitrito1, nitrato1, amonio1). Experimento 2, amonio2 y nitrito2 a una concentración de 0.2mg/l y nitrato2 a 0.3 mg/l. Experimento 3, amonio3 y nitrito3 a una concentración de 0.25 mg/l y el nitrato3 a 0.5 mg/l. Experimento 4, el amonio y el nitrito a una concentración de 0.3 mg/l y el nitrato a 2 mg/l. Experimento 5, el amonio y el nitrito a una concentración de 0.35 mg/l y el nitrato a 4 mg/l. Experimento 6, el amonio y el nitrito a una concentración de 0.5 mg/l y el nitrato a 5 mg/l. Experimento 7, el compuesto nitrato a una concentración de 7 mg/l.

Tabla 3. Valores de número y porcentaje de organismos muertos por ausencia de desarrollo o desarrollo incompleto, número y porcentaje de organismos eclosionados sanos, número y porcentaje de organismos con malformación (en huevo y eclosionado) y tipos de malformación en cada concentración

Lote experimental	Concentración en mg/l de los reactivos	Número y porcentaje de organismos muertos por ausencia de desarrollo o desarrollo incompleto		Número y porcentaje de organismos eclosionados sanos		Número y porcentaje de organismos con malformación (en huevo y eclosionado)		Tipos de malformación
Nitrito 1	0.1	5	6.25%	73	91.25%	2	2.5%	CURVAMIENTO DE ESPINA DORSAL
Nitrito 2	0.20	32	40%	48	60%	0		
Nitrito 3	0.25	62	77.5%	13	16.25%	2	2.5%	CURVAMIENTO DE ESPINA DORSAL
						3	3.75%	
Nitrito 4	0.30	42	52.5%	35	43.75%	3	3.75%	CURVAMIENTO DE ESPINA DORSAL
Nitrito 5	0.35	50	62.5%	22	27.5%	6	7.5%	CURVAMIENTO DE COLA
						1	1.25%	EDEMA
						1	1.255	AUSENCIA DE COLA
Nitrito 6	0.5	64	80%	10	12.5%	4	5%	CURVAMIENTO DE ESPINA DORSAL
						1	1.25%	PRESENCIA DE EDEMAS
						1	1.25%	ORGANISMO ECLOSIONADO SIN COLA
Nitrato 1	0.1		2632.5%	54	67.5%	1	1.25%	CURVAMIENTO DE ESPINA DORSAL

de los lotes de compuestos nitrogenados y los lotes control.

Continuación de la tabla 3. Valores de número y porcentaje de organismos muertos por ausencia de desarrollo o desarrollo incompleto, número y porcentaje de organismos eclosionados sanos, número y porcentaje de organismos con malformación (en huevo y eclosionado) y tipos de malformación en cada concentración de los lotes de compuestos nitrogenados y los lotes control.

Lote experimental	Concentración en mg/l de los reactivos	Número y porcentaje de organismos muertos por ausencia de desarrollo o desarrollo incompleto		Número y porcentaje de organismos eclosionados sanos		Número y porcentaje de organismos con malformación (en huevo y eclosionado)		Tipos de malformación
Nitrato 2	0.30	30	37.5%	50	62.50%	0		
Nitrato 3	0.5	10	13.3 %	66	83.3%	4	5 %	CURVAMIENTO DE ESPINA DORSAL
Nitrato 4	2	35	43.75%	45		0		
				56.25%				
Nitrato 5	4	70	87.5	4	5%	2	2.5%	PRESENCIA DE EDEMAS
						3	3.75%	
						1	1.25%	CURVAMIENTO DE ESPINA DORSAL
								AUSENCIA DE COLA.
Nitrato 6	5	77	96.25%	3	3.75%	0		
Nitrato 7	7	74		6		0		
		92.5		7.5%				
Amonio 1	0.1	11	13.75%	68	85%	1	1.25%	PRESENCIA DE EDEMAS
Amonio 2	0.20	59		21		2	2.5%	AUSENCIA DE COLA
		73.75%		26	.25%			
Amonio 3	0.25	63	78.7%	15	18.75%	2	2.5%	CURVAMIENTO DE ESPINA DORSAL

Continuación de la tabla 3. Valores de número y porcentaje de organismos muertos por ausencia de desarrollo o desarrollo incompleto, número y porcentaje de organismos eclosionados sanos, número y porcentaje de organismos con malformación (en huevo y eclosionado) y tipos de malformación en cada concentración de los lotes de compuestos nitrogenados y los lotes control.

Lote experimental	Concentración en mg/l de los reactivos	Número y porcentaje de organismos muertos por ausencia de desarrollo o desarrollo incompleto		Número y porcentaje de organismos eclosionados sanos		Número y porcentaje de organismos con malformación (en huevo y eclosionado)		Tipos de malformación
Amonio 4	0.30	13	16.25%	63	78.75%	2	2.5%	CURVAMIENTO DE ESPINA DORSAL
						1	1.25%	
						1	1.25%	MÚLTIPLES ANOMALÍAS
								EDEMA
Amonio 5	0.35	71	88.75%	8		1	1.25%	EDEMA
					10%			
Amonio 6	0.5	80	100%	0	0%	0		
Control 1	-----	10	12.5%	73	91.6%	0		
Control 2	-----	18	22.5%	62	77.5%	0		
Control 3	-----	18	22.5%	62	77.5%	0		
Control 4	-----	13	16.25	67		0		
					83.75%			
Control 5	-----	8		72		0		
			10%		90%			
Control 6	-----	19	23.75%	61	76.25%	0		
Control 7	-----	6	7.5%	63	78.5%	0		

Malformaciones

Las malformaciones observadas fueron las siguientes: curvamiento de espina dorsal , ausencia de cola, edemas y lo que llame multiples anomalias que incluyen la presencia de edemas y desarrollo incompleto. Es importante mencionar que las dos primeras solo se observaron en las larvas recién eclosionadas, mientras que los edemas, las múltiples anomalías y el desarrollo incompleto se encontraron en los embriones. Las imágenes de estas malformaciones se puede observar en el apéndice II.

Los porcentajes más altos de curvamiento de espina dorsal (5 y 7.5%) se presentaron en el tratamiento de nitrito a concentraciones de 0.35 y 0.5 mg/l, mientras que en el tratamiento de nitrato se encontró también un porcentaje alto (5%) a una concentración de 0.5 mg/l (Fig. 3). Se considero este porcentaje alto, debido a que Blaustein y Johnson, (2003b) indican que si en una población se encuentra un porcentaje igual o mayor a 5% de malformaciones, esta se encontraría en peligro inminente de extinción. Es importante mencionar que en los lotes control no se presentó esta anomalía.

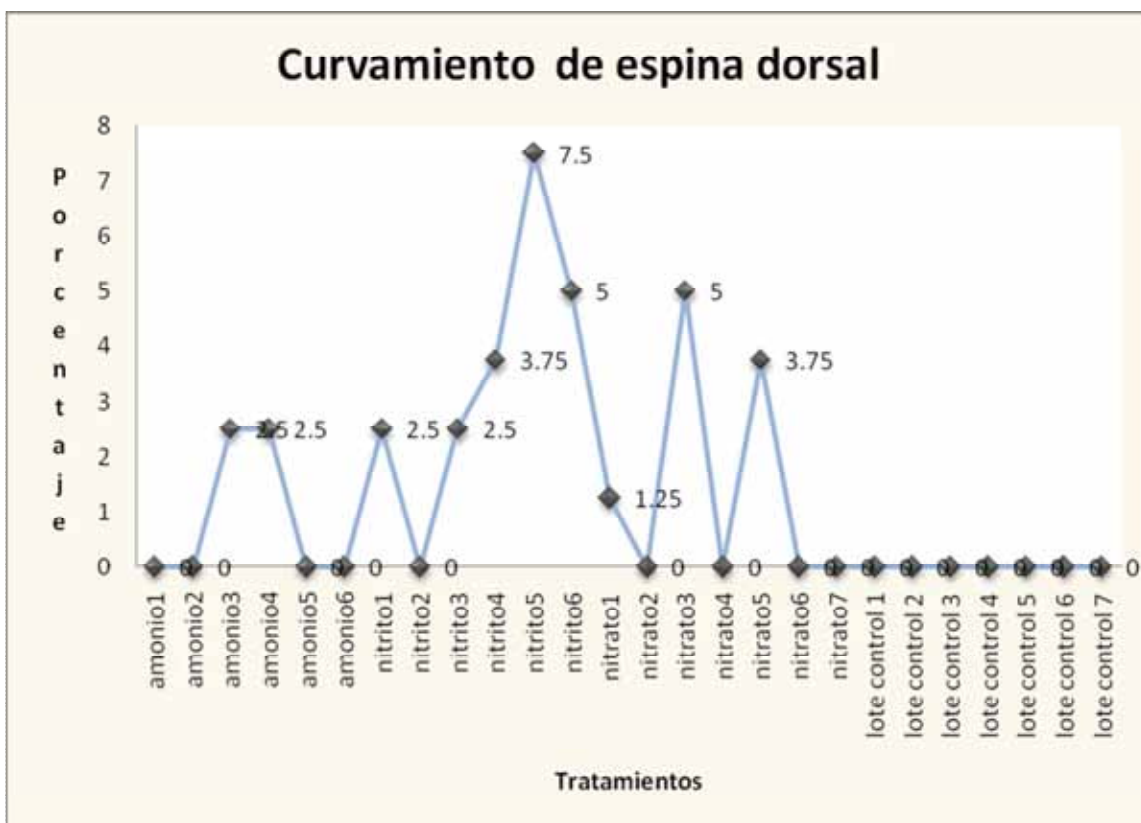


Figura 3. Porcentaje de la presencia de curvamiento de espina dorsal. Ver tabla tres para concentraciones de cada experimento.

Las otras tres malformaciones: 1) edemas, 2) ausencia de cola, y 3) múltiples anomalías, no tuvieron un porcentaje igual o mayor de 5% de frecuencia, por lo que, no se les consideraron altas y peligrosas para la población. No obstante, estas anomalías no se presentaron en ninguno de los lotes control.

Desarrollo incompleto

El desarrollo incompleto se presentó en porcentajes bajos en los experimentos con concentraciones bajas (0.1 mg/l) de compuestos nitrogenados. Este evento aumentó su frecuencia a partir del 2° experimento de los tres compuestos, llegando hasta el 100% en el caso de los tratamientos con concentraciones altas de amonio (0.5 mg/l); en comparación a los lotes control en los cuales se obtuvieron porcentajes de desarrollo incompleto entre el 7 y el 24 (Fig. 4).

Las imágenes obtenidas del desarrollo incompleto se pueden observar en el apéndice III.

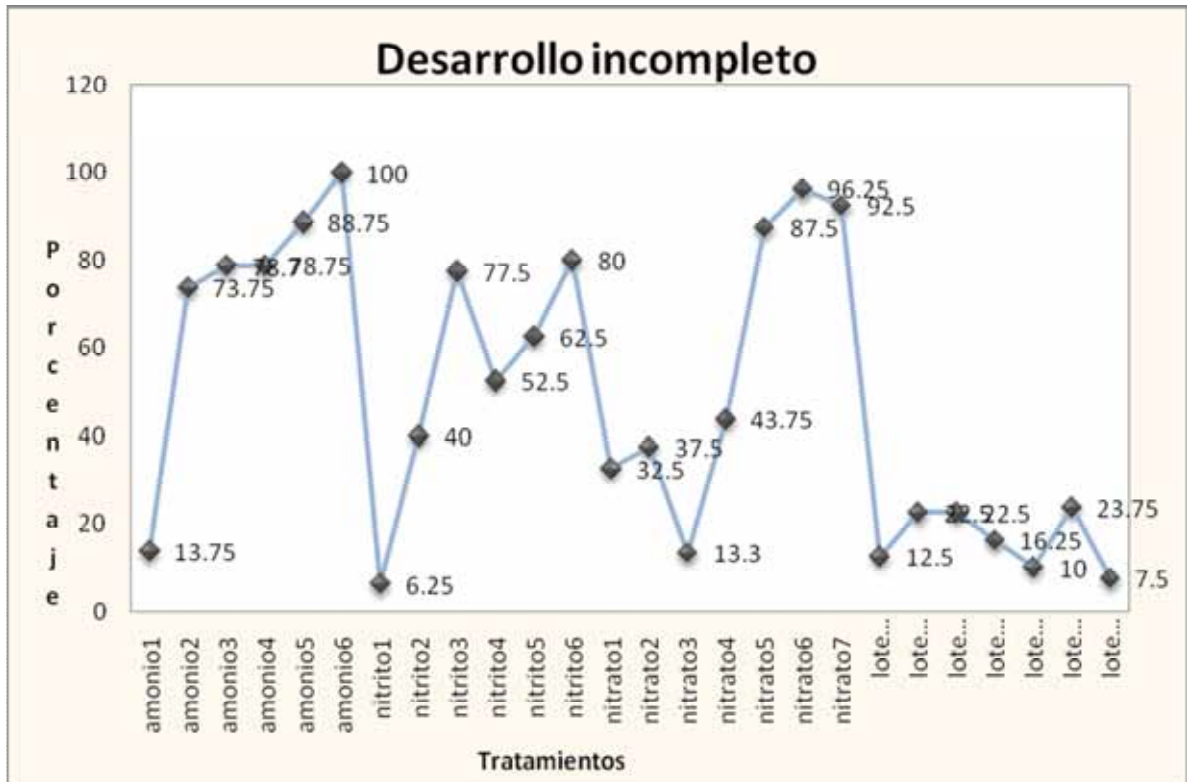


Figura 4.- Porcentaje de desarrollo incompleto en cada experimento.

Tamaño corporal en recién eclosionados

La longitud de cada organismo eclosionado para cada uno de los experimentos se presenta en el apéndice IV. En la tabla 4, se muestra a manera de resumen el promedio y la desviación estándar de la longitud hocico-cola de los organismos eclosionados en cada experimento.

Tabla 4. Se presenta el promedio y la desviación estándar de los datos de la longitud hocico-cola de los organismos recién eclosionados en cada experimento.

El símbolo -----significa ausencia de dato debido a que ningún organismo eclosiono y por lo tanto no fue posible tomar alguna medida de longitud.

Tratamiento	Concentración en mg/l	Promedio de longitud total	Desviación estándar
Nitrito 1	0.1	14.43	0.90
Nitrito 2	0.20	12.85	0.88
Nitrito 3	0.25	11.25	0.91
Nitrito 4	0.3	13.12	1.05
Nitrito 5	0.35	11.442	0.91
Nitrito 6	0.5	11.53	0.84
Nitrato 1	0.1	14.32	0.80
Nitrato 2	0.3	12.95	0.91
Nitrato 3	0.5	14.82	0.63
Nitrato 4	2	12.64	1.15
Nitrato 5	4	12.77	0.86
Nitrato 6	5	11.68	1.77
Nitrato 7	7	10.55	0.78
Amonio 1	0.1	13.46	0.71
Amonio 2	0.20	12.75	0.84
Amonio 3	0.25	10.88	0.66
Amonio 4	0.3	11.60	1.46
Amonio 5	0.35	11.79	0.82
Amonio 6	0.5	-----	-----
Control 1	0	14.78	0.66
Control 2	0	14.40	0.78
Control 3	0	12.84	0.21
Control 4	0	12.82	0.97
Control 5	0	13.04	0.94
Control 6	0	14.40	0.88
Control 7	0	13.83	0.94

El análisis de varianza anidado, que toma en cuenta la longitud de los organismos recién eclosionados (en los primeros seis experimentos) entre los lotes de los compuestos nitrogenados y el lote control, arrojó un resultado de $F_{3,63}=.59292$; $P>0.05$. Este valor indica que no hay diferencias significativas en las longitudes, por lo que ningún compuesto afectó significativamente el crecimiento de los organismos de *Ambystoma mexicanum* expuestos a los tratamientos del presente estudio. En la figura 5 se aprecia que las barras que muestran el intervalo de la longitud de cada tratamiento no difieren significativamente entre sí; sin embargo las barras que representan las longitudes de los lotes control y nitrato son muy similares, lo que corrobora que el nitrato es el compuesto nitrogenado menos letal con respecto al nitrito y amonio.

De la misma manera, el análisis indicó que no hubo diferencias significativas en la longitud de los organismos, cuando la prueba tomó en cuenta las concentraciones y los compuestos nitrogenados ya que se obtuvo un resultado de $F_{19,63}=.97741$; $P>0.05$ el cual señala que las longitudes no difieren de manera significativa. La figura 6 muestra la poca fluctuación de la longitud teniendo como variable independiente la concentración y la longitud como variable dependiente.

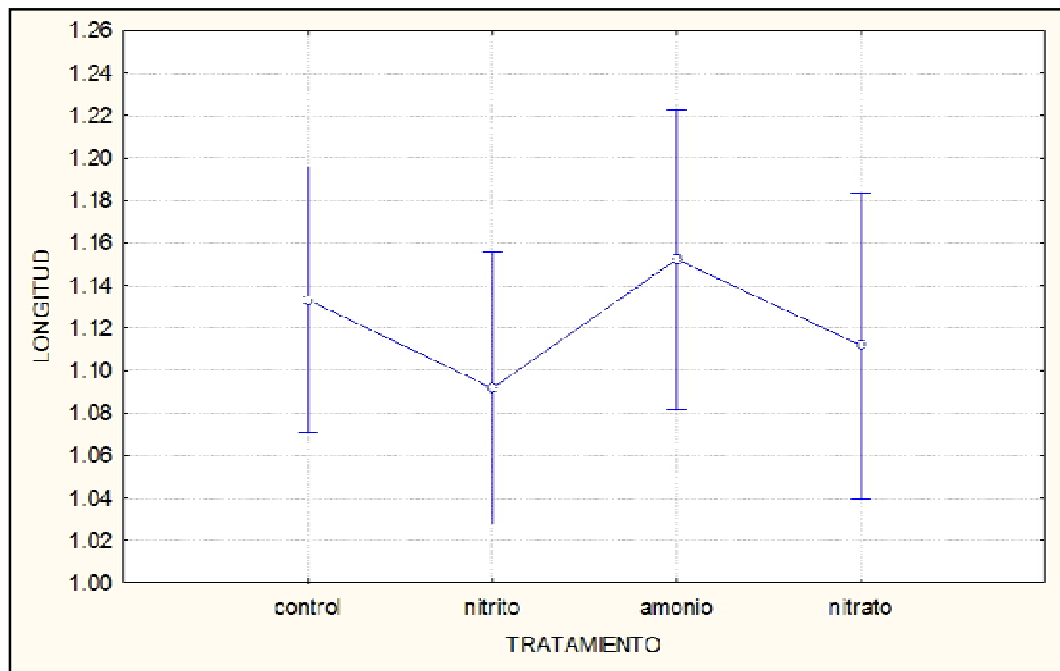


Figura 5. Grafica que muestra los valores de longitud para los cuatro lotes experimentales.

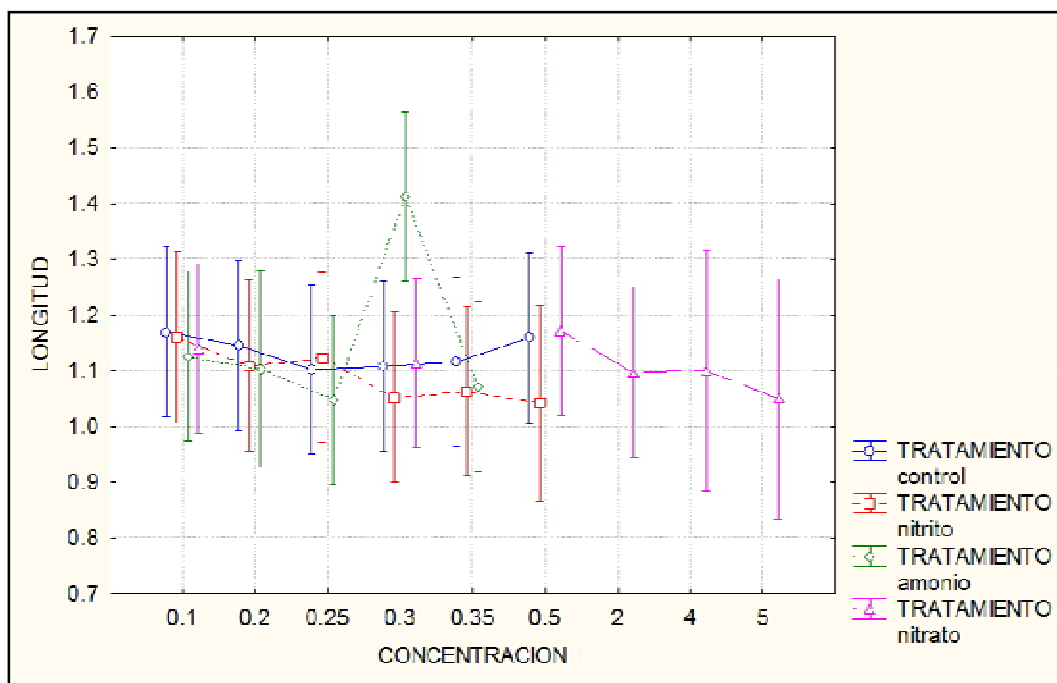


Figura 6. Grafica que muestra la oscilación entre los valores de longitud para los cuatro lotes experimentales.

Tasa de supervivencia

En la Figura 7, se muestra el porcentaje de supervivencia de los organismos en los diferentes lotes experimentales. En general, la supervivencia fue alta cuando los huevos se expusieron a los tres compuestos nitrogenados en una concentración baja (0.1 mg/l). En la gráfica se observa claramente que en el caso del amonio la supervivencia fue declinando conforme aumentaba la concentración del compuesto. En los lotes experimentales de nitrito y nitrato se aprecia notoriamente el patrón de declive de supervivencia entre los primeros dos experimentos y en los últimos dos; sin embargo, no se observa el patrón de forma continua como en el caso de amonio. En lo que respecta a los lotes control podemos notar que el porcentaje de supervivencia mantiene un equilibrio entre 76 y 91 %.

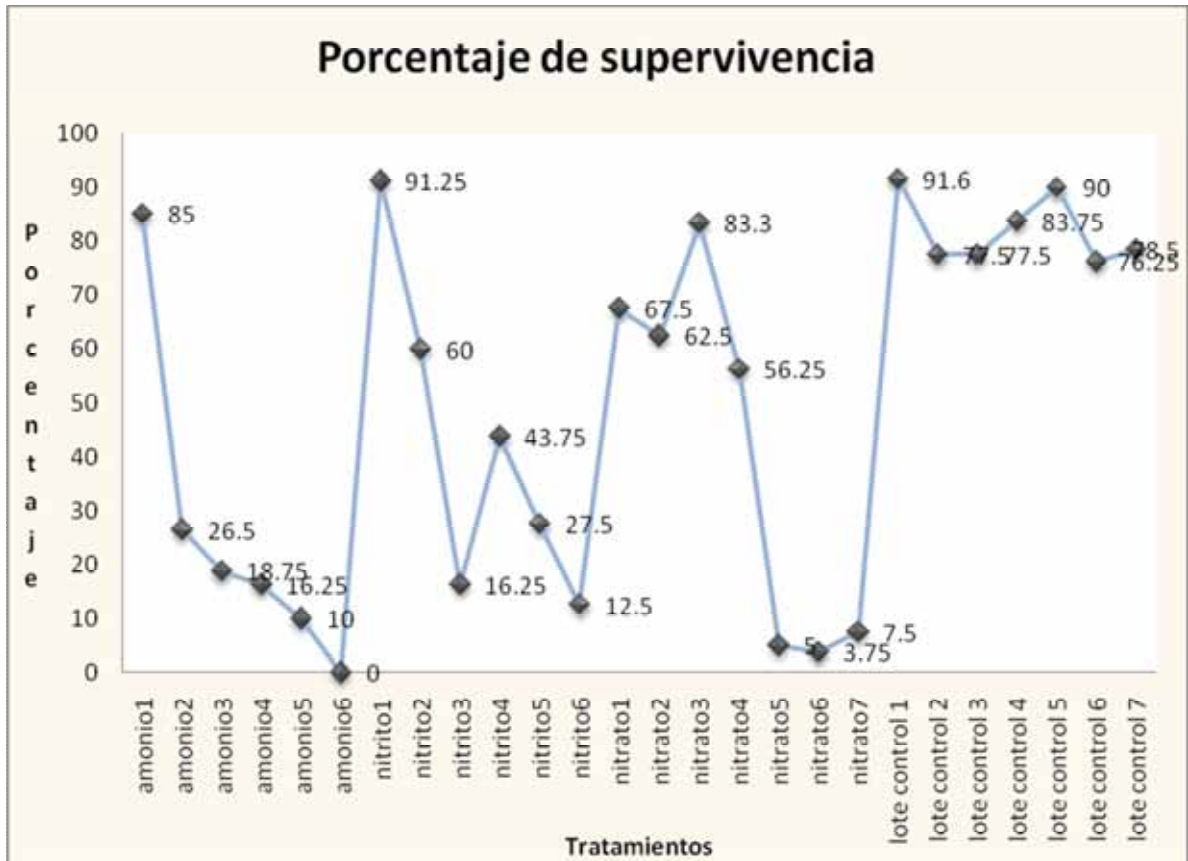


Figura 7.- Porcentaje de la supervivencia en cada experimento. Ver concentraciones correspondientes en Tabla 5.

El análisis de varianza (ANOVA) anidado, que tomo en cuenta la supervivencia entre los compuestos nitrogenados y el lote control, arrojó un resultado de $F_{3, 72}=45.900$; $P<0.05$ el cual indicó la existencia de diferencias significativas. En la figura 8, se observa de manera clara que los tres compuestos nitrogenados afectaron la supervivencia de embriones siendo el amonio el compuesto más toxico.

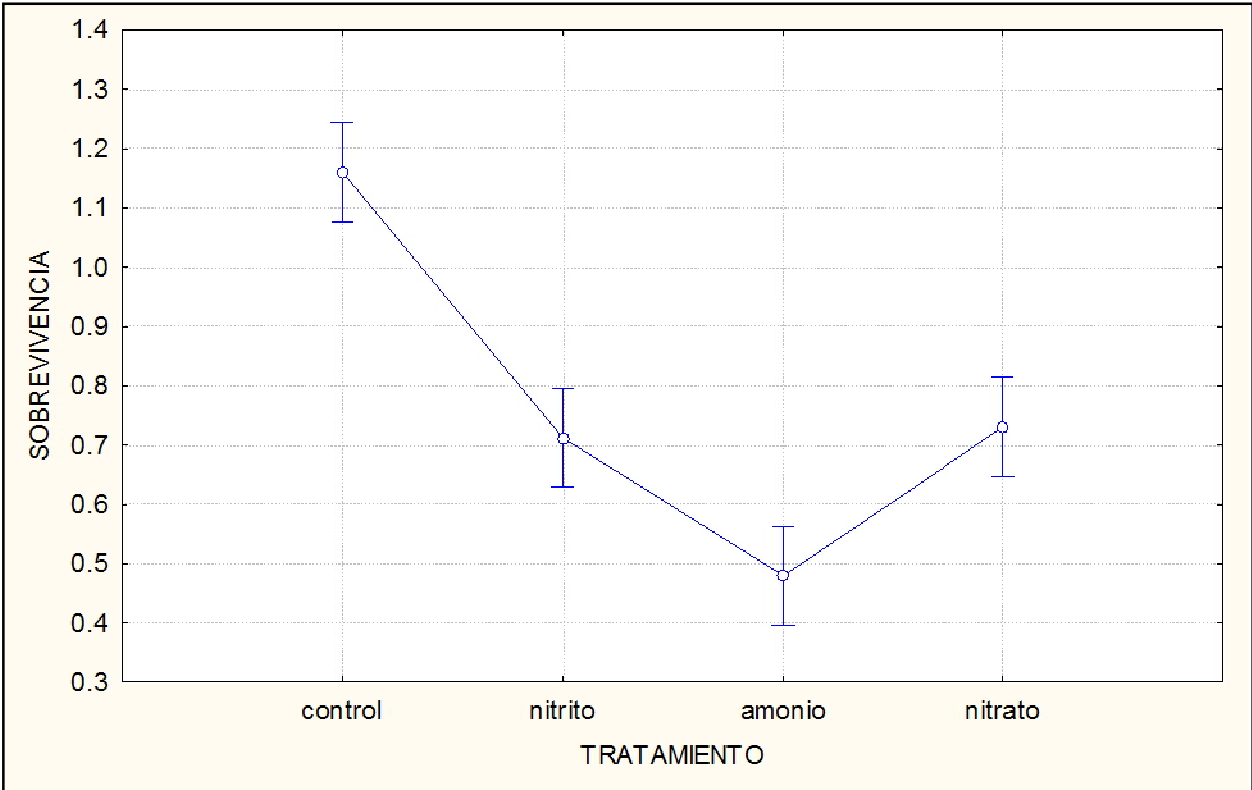


Figura 8. Grafica que muestra los diferentes valores de supervivencia para los cuatro lotes experimentales.

Tomando en cuenta las concentraciones, el análisis de varianza anidado indicó un resultado de $F_{20,72}=13.572$; $P<0.05$ el cual indicó la existencia de diferencias significativas en la supervivencia entre las diferentes concentraciones de compuestos nitrogenados. En la figura 9, se observa que a excepción del tratamiento control hay una declinación de la supervivencia cuando la concentración de los compuestos aumenta. Hay que destacar que el compuesto nitrato afecta a la supervivencia de los embriones a partir de una concentración mayor a 2 mg/l; mientras que el compuesto amonio presenta una alta tasa de mortalidad a partir de 0.5 mg/l.

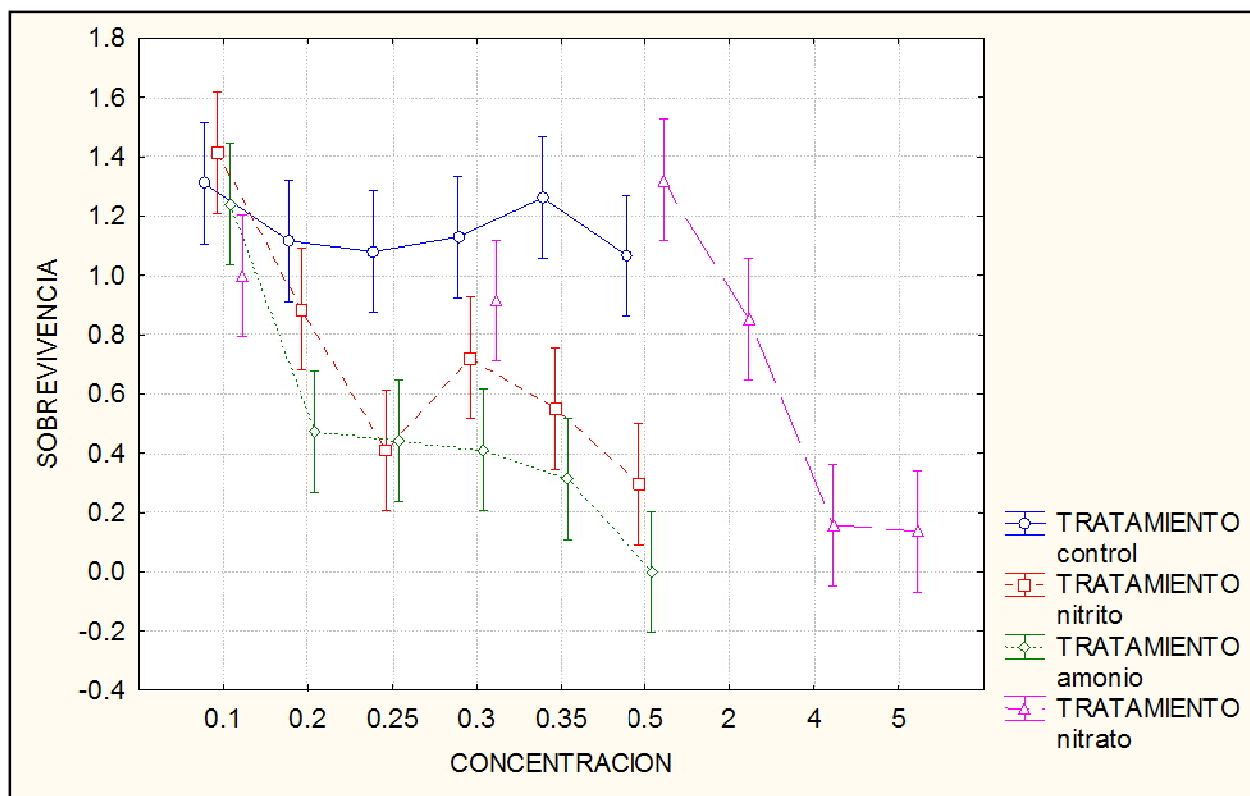


Figura 9. Grafica que muestra la oscilación entre los valores de supervivencia para los cuatro lotes experimentales.

La prueba de Tuckey señaló en primer lugar que los lotes control entre sí no tuvieron diferencias significativas, por lo que ningún tratamiento de este tipo afectó la supervivencia de los embriones de *A. mexicanum*. Es importante destacar que no hubo diferencias significativas entre todos los compuestos nitrogenados a una concentración de 0.1 mg/l con respecto a los lotes control, por lo que a esta concentración ningún compuesto afecta la supervivencia de los embriones de *A. mexicanum*.

El análisis también indicó que el nitrito a partir de la concentración de 0.25 mg/l tuvo diferencias con los lotes control por lo que desde esa concentración el compuesto perjudica la supervivencia; igualmente la prueba mostró que existen diferencias significativas entre los lotes con 0.1 mg/l y los que tuvieron una concentración igual o mayor a 0.25 mg/l del mismo compuesto.

Referente al nitrato, este perjudica a la supervivencia a partir de la concentración de 4 mg/l, lo que indica que este es el compuesto nitrogenado que perjudica menos la supervivencia en comparación con el amonio y el nitrito.

DISCUSION

Ambystoma mexicanum, es una especie emblemática para la cultura mexicana ya que desde los antiguos Aztecas se ha reconocido su importancia histórica, cultural y económica. Sin embargo, esta especie se encuentra en estado crítico de conservación. Algunos de los factores que han causado la dramática disminución de la población de *A. mexicanum* incluyen: 1) el estado deplorable de su hábitat, ocasionado principalmente por la desecación y las perturbaciones antropogénicas, que a lo largo de muchos años han mermado la calidad del agua de su hábitat (Zambrano *et al.*, 2008) 2) la introducción de especies exóticas tales como la carpa y la tilapia que actúan como depredadores (Valiente, 2006) 3) la captura comercial (Casas-Andreu *et al.*, 2003) y 4) la contaminación del lago de Xochimilco. Específicamente, la contaminación por nitrógeno es muy alta debido a que los habitantes vierten desechos y agua residual a los canales, convirtiéndolos en tiraderos de basura orgánica e inorgánica, además los agricultores han optado por el uso indiscriminado de insecticidas y fertilizantes los cuales están hechos primordialmente a base de nitrógeno (De la Rosa, 2006).

Malformaciones morfológicas.

Este trabajo registra tres tipos de malformaciones: curvamiento de cola y espina dorsal, edemas y ausencia de cola. Todas las malformaciones fueron provocadas por los tres compuestos nitrogenados utilizados; sin embargo, existieron algunas diferencias en las frecuencias de cada malformación en cada compuesto.

En el caso del amonio, se apreció un aumento en la frecuencia de las malformaciones a medida que la concentración del compuesto se incrementó; sin embargo, a partir de la concentración de 0.35 mg/l se observa que el compuesto provoca una alta tasa de mortalidad y por lo tanto los registros de malformaciones disminuyen. En el estudio de Schuytema y Nebeker, (1999) se registró que el 70% de 28 organismos sobrevivientes de *Pseudacris regilla* expuestos a concentraciones de aproximadamente 25.1 mg/l de cloruro de amonio, exhibieron curvamiento de espina dorsal y edemas. Estas malformaciones se obtuvieron en el presente estudio a menor concentración, lo que podría indicar que los embriones de *Ambystoma mexicanum* presentan menor resistencia a la presencia de malformaciones.

Bajo el compuesto de nitrito se presentaron todas las malformaciones, pero se aprecia que en casi todos los experimentos excepto en la concentración de 0.20 mg/l se observó el curvamiento de cola y espina dorsal, además de que el porcentaje de frecuencia de esta malformación observado en este

compuesto fue el más alto (7.5 %) a diferencia de los otros 2 reactivos. Para contrastar este estudio es importante señalar que Marco *et al.* (1999) mencionan que larvas recién eclosionadas de los anfibios *Anaxyrus boreas*, *Pseudacris regilla* y *Ambystoma gracile* expuestas a altas concentraciones de nitrito (7 mg/l de nitrito de sodio) mostraron edemas, y encorvamientos de cola, mientras que en el presente trabajo, los embriones tuvieron una mortalidad de 80 % a concentraciones de 0.5 mg/l pero sí se presentaron ambas malformaciones por lo que los datos de ese estudio corroboran nuestros resultados.

En el tratamiento de nitrato, se observó que a medida que la concentración era más alta se presentaba mayor porcentaje de malformaciones (excepto en el último experimento porque hubo una mortalidad del 100%). Se presentaron los tres tipos de malformaciones; sin embargo, solo el curvamiento de espina dorsal mostró un porcentaje alto (5%) a una concentración de 0.5 mg/l. Es importante destacar que en los experimentos con este reactivo, se encontró mayor diversidad de malformaciones, debido a que los embriones tuvieron una tasa baja de mortalidad por lo que el estrés, provocado por este compuesto durante el desarrollo embrionario pudo provocar tales anomalías. En lo que respecta a otras investigaciones similares, Marco *et al.* (1999) mencionan que larvas de *Ambystoma gracile*, expuestas a concentraciones de nitrato de sodio (12.5 y 25 mg/l) presentaron edemas y curvamientos de cola, mientras que en nuestro trabajo se presentaron las mismas malformaciones. Ortiz *et al.* (2004) mencionan que *Discoglossus galganoi*, *Bufo bufo* y *B. calamita* presentaron malformaciones como edemas, doblamiento de cola y curvamiento de espina dorsal “lordosis”. De igual manera en este trabajo bajo el tratamiento de nitrato (a 0.1 y 0.5 y 4 mg/l) se presentaron edemas y curvamiento de espina dorsal, por lo que los resultados del presente estudio son similares a los de Ortiz *et al.* (2004).

Por último, de acuerdo a los antecedentes encontrados, este trabajo presenta un nuevo registro de malformación en anfibios recién eclosionados, este fue la ausencia de cola, además, con los datos obtenidos se concluye que la única malformación con una frecuencia significativa fue el curvamiento de espina dorsal, ya que Blaustein y Johnson, (2003a), mencionan que la frecuencia normal de malformaciones ocasionadas por mutaciones, errores en el desarrollo y traumas es por debajo del 5%.

Desarrollo incompleto.

Esta irregularidad en el desarrollo consistió en que los embriones murieron pero alcanzaron un determinado estadio de desarrollo. Esta anomalía aumentó a partir del 2° experimento en los tratamientos con contaminantes, llegando a una frecuencia de hasta el 100% a una concentración de 0.5

mg/l de cloruro de amonio; sin embargo, en los lotes control en ningún experimento se obtuvo un porcentaje mayor del 20%, lo que indica que los compuestos de nitrógeno provocan frecuentemente esta anomalía en el desarrollo. Es importante destacar que a medida que las concentraciones de compuestos nitrogenados se incrementaron, la frecuencia de desarrollo incompleto se acrecentó; sin embargo, los valores de se mantuvieron constantes en los tratamientos control. La aseveración anterior se demuestra también con los resultados obtenidos en los análisis de tabla de contingencia y de correspondencia, ya que sugieren que el desarrollo incompleto y por lo tanto la mortalidad están asociados a los lotes con los compuestos nitrogenados a concentraciones más altas de 0.1 mg/l.

Longitud de los organismos recién eclosionados expuestos a compuestos nitrogenados.

A través de los resultados del análisis de varianza anidado se puede concluir que los tratamientos de los compuestos nitrogenados a cualquier concentración no afectaron el crecimiento de los organismos de *Ambystoma mexicanum*. El trabajo de Ortiz *et al.* (2004) señala que embriones y larvas de la salamandra *Pleurodeles waltl*, tuvieron un tamaño pequeño cuando se expusieron a altas concentraciones de nitrato de amonio, este resultado contradice el de este trabajo; sin embargo, es importante destacar que a partir de la concentración de 0.25 mg/l de amonio, la tasa de mortalidad fue alta y además se obtuvieron algunos datos de longitud desde 8.91 mm, los cuales fueron eventos raros en otros tratamientos, esto sugiere que posiblemente no se obtuvo estadísticamente una talla significativamente menor en los organismos bajo el tratamiento de amonio debido a que el análisis necesito más datos que corroboraran esto.

Supervivencia.

Este trabajo demostró que la tasa de supervivencia de embriones y larvas recién eclosionados de *A. mexicanum* se ve afectada bajo algunas concentraciones de compuestos nitrogenados presentes en los canales de Xochimilco. Por ejemplo, el amonio fue el compuesto más letal para los embriones de la especie, ya que a concentraciones de escasos 0.20 mg/l la supervivencia de los embriones fue de 26%. En contraste Schuytema y Nebeker (1999) encontraron que el cloruro de amonio afectó de menor manera a la supervivencia de embriones de los anuros *Pseudacris regilla* y *Xenopus laevis* ya que la primer especie mostró una supervivencia de 76.7 % en una concentración de 49.7 mg/l, mientras que la segunda especie tuvo una supervivencia de 73.3% a una concentración de 49.1 mg/l. Las diferencias pudieron deberse a los modelos de especies, por lo que *Ambystoma mexicanum* parece ser más sensible a la contaminación de nitrógeno.

Los resultados de este estudio señalan que en el caso del nitrito, la supervivencia fue de 12.5% a una concentración de 0.5 mg/l, a diferencia del amonio en la que se registró una mortalidad de 100%, mientras que en el tratamiento de nitrato se obtuvo una supervivencia de 83.3%. Por lo anterior, se concluye que el nitrito fue menos letal que el amonio. Los resultados del compuesto de nitrito en esta investigación varían de manera significativa con otros estudios. Por ejemplo Marco *et al.* (1999) encontraron que las larvas de la especie *Rana pretiosa* no fueron muy sensibles al tratamiento de nitrito ya que presentaron una sobrevivencia de 83.3% a una concentración de 0.44 mg/l. Posiblemente estos resultados son diferentes porque los autores expusieron larvas y no huevos al compuesto, por lo que éstas podrían haber presentado más resistencia.

Por otro lado, el contaminante nitrato fue el menos letal, ya que se observó que a concentraciones de 0.5 mg/l los organismos mostraron una supervivencia alta (83.3%) en comparación con los resultados en los tratamientos con nitrito y amonio, en los cuales a la misma concentración tuvieron entre un 80 y 100% de mortalidad. En lo que respecta a otras investigaciones similares, Marco *et al.* (1999) mencionan que larvas de *Ambystoma gracile*, expuestas a concentraciones de nitrato de sodio (12.5 y 25 mg/l) presentaron una supervivencia de 80 y 50%, en contraste en este trabajo, en el que se presentó una mortalidad de más de 90% en el tratamiento con 7 mg/l de nitrato de sodio. La diferencia en el porcentaje de supervivencia pudo deberse a que las larvas podrían estar presentando mayor resistencia que los embriones a los efectos del compuesto. Por otro lado Ortiz *et al.* (2004) realizaron estudios de los efectos de la contaminación por nitrato de amonio en embriones y larvas de la salamandra *Pleurodeles waltl*, encontrando una mortalidad baja (menos del 10%) a concentraciones de hasta 200 mg/l de nitrato de amonio. Las diferencias entre este estudio y el de Ortiz *et al.* (2004) podrían haber sido causadas por los organismos utilizados, al igual que el estadio en el que se expusieron los huevos al reactivo, ya que los autores sometieron los huevos a partir del estadio 10 a 12, en cambio en este trabajo se requirió que los experimentos se realizaran con huevos desde el estadio 0 hasta el 44. Otra diferencia entre los dos experimentos es el tipo de reactivo ya que en el presente trabajo, siguiendo las sugerencias de Schuytema y Nebeker (1999) y Hatch y Blaustein (2003) se seleccionó el cloruro de amonio y no el nitrato de amonio, ya que en este último la toxicidad podría ser ocasionada por el ion amonio o el ion nitrato. Por otro lado Schuytema y Nebeker (1999) expusieron embriones de *Pseudacris regilla* y *Xenopus laevis* a nitrato de sodio a concentraciones de 0.1 a 2716 mg/l. Los resultados mostraron que *P. regilla* presentó una supervivencia de 20% a una concentración de 50.9 mg/l, mientras que *X. laevis* a una concentración de 25.1mg/l, tuvo una supervivencia de 86.7%. Lo anterior podría confirmar que los anuros en comparación con las salamandras presentan más resistencia a la contaminación de nitrógeno.

Con los resultados mencionados, este trabajo concluye que a partir de una concentración de 0.20 de amonio, 0.25 de nitrito y de 4 mg/l de nitrato la supervivencia de los organismos disminuyó más de 80%. Estos datos fueron corroborados con el análisis de varianza anidado el cual señaló que a dichas concentraciones de compuestos nitrogenados la supervivencia es significativamente diferente a lo obtenido en los lotes control. Es importante mencionar que se eligió el análisis de varianza (ANOVA) anidado debido a que las concentraciones que se utilizaron fueron diferentes ya que dependieron de la cantidad de compuesto en el Lago de Xochimilco. En este trabajo por ejemplo, el nitrato se encuentra en mayores concentraciones en comparación con el nitrito y amonio; mientras que estos últimos se encuentran en la misma cantidad. Además la teoría del análisis de varianza anidado menciona que los modelos para diseños de muestreo anidado deben de presentar más de un componente aleatorio, es decir dos variables independientes que posean variabilidad entre cada una (Mendenhall y Sincich, 1997), los cuales en este trabajo serían el tratamiento (nitrito, nitrato y amonio) y la concentración.

Vinculación de resultados con el hábitat del Lago de Xochimilco.

Durante esta investigación en condiciones de laboratorio utilizando concentraciones de 0.5 mg/l de amonio y nitrito y las de 4 a 9 mg/l de nitrato imitando los niveles en el hábitat de *A. mexicanum* se encontró que estos contaminantes perjudican de manera grave la supervivencia y desarrollo de la especie en los primeros estadios de vida. Por lo tanto, la alta mortalidad, ausencia de desarrollo, tamaño pequeño y presencia de malformaciones en los embriones y larvas de la especie podrían estar ocurriendo en vida silvestre. Sin embargo, esto sólo se podría saber con exactitud si el experimento se hubiera realizado con una metodología de mesocosmos y no de microcosmos como fue el caso del presente estudio. Además hay que tomar en cuenta que el Lago de Xochimilco es heterogéneo en sus condiciones ambientales por lo que los valores de los parámetros físico-químicos no siempre son iguales, no obstante, este trabajo señala que si la contaminación sigue en aumento junto con los otros factores de declinación para la especie; la población de *A. mexicanum* en el Lago de Xochimilco podría desaparecer. Ante esta problemática es necesario ejecutar acciones con el fin de disminuir la contaminación en el lago. UNESCO (2006) proporcionó un plan de manejo eficaz para la conservación y administración del agua. Los puntos a seguir de este plan son: 1) incrementar la inversión en obras hidráulicas de las plantas que tratan el agua que se vierte en Xochimilco, 2) reforestar el área de montaña además de rehabilitar los cuerpos de agua de la subcuenca Xochimilco con la finalidad de alimentar los canales con agua de diferente calidad, 3) establecer un sistema de drenaje principal en la zona que rodea las chinampas para que rebombee hacia el canal profundo, 4) controlar el crecimiento de la población humana en los márgenes de los canales, controlar las descargas de aguas residuales hacia los canales

con la introducción de baños ecológicos, secos o húmedos, 5) capacitar a productores agrícolas y floricultores para reducir el uso de agroquímicos y 6) fomentar la cultura de conservación y uso sustentable del agua, tanto de la población local como la del Distrito Federal. Sin lugar a dudas, el cumplimiento de estos puntos reduciría enormemente la contaminación del Lago de Xochimilco; sin embargo, las autoridades no han realizado en su totalidad este plan de manejo.

CONCLUSIONES

- Los organismos de *Ambystoma mexicanum* expuestos en condiciones experimentales a diferentes concentraciones de nitrito, nitrato y amonio similares a las de su hábitat en el Lago de Xochimilco presentaron:
 - a) Desarrollo incompleto y edemas en los estadios 0 al 43 (estadios embrionarios).
 - b) Curvamiento de cola y espina dorsal y ausencia de cola en el estadio 44 (organismos recién eclosionados).
- Las anomalías morfológicas observadas con frecuencia significativa fueron el desarrollo incompleto y el curvamiento de cola y espina dorsal.
- Las concentraciones de los compuestos nitrogenados utilizadas no afectaron el crecimiento de los organismos en el estadio 44.
- El compuesto nitrogenado que afectó más a la supervivencia y desarrollo de *A. mexicanum* fue el cloruro de amonio seguido del nitrito de sodio y nitrato de sodio.
- A partir de una concentración de 0.20 mg/l de cloruro de amonio, 0.25mg/l de nitrito de sodio y de 4 mg/l de nitrato de sodio la supervivencia de los organismos disminuyó más de 80%.

LITERATURA CITADA

- Alford, R.A y Richards, S.J.** 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 30: 133-165.
- Armstrong, J.B y Malacinski, G.M.** 1989. Developmental biology of the axolotl. New York: Oxford University, pp 320.
- Berger, L, Speare, R, Daszak, P, Green, D. E, Cunningham, A. A, Goggin, C. L, Slocombe .R, Ragan, M. A, Hyatt, A. D, mcdonald, K. R, hines, H. B, Lips, K. R, Marantelli, F y Parkes, H.** 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Science*. 92:9031–9036.
- Blanco, C. M.** 1995. La trucha “Cría industrial”. México: Mundi-Prensa, pp 80.
- Blaustein, A. R y Wake, D. B.** 1990. Declining Amphibian Populations: A Global Phenomenon. *Trends in Ecology and Evolution*. 5: 203- 204.
- Blaustein, A. R. y Kiesecker, J. M.** 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology letters*. 5: 597-608.
- Blaustein, A. R y Johnson, P. T.** 2003a. The complexity of deformed amphibians. *The Ecological Society of America*. 1: 87-94.
- Blaustein, A. R y Johnson, P.T.** 2003b. Malformaciones en anfibios. *Investigación y Ciencia*. 319: 46-52.
- Blaustein, A. R, Romansic, J, Kiesecker, J. M y Hatch, A. C.** 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and distributions*. 9:123-140.
- Buttner, J. K. y Nace, G.W.** 1984. Labile water quality parameters in amphibian holding systems. *Axolotl newsletter*. 13: 38-43.
- Brandon, R.A.** 1989. Size range, size at maturity and reproduction of *Ambystoma (Bathysiredon) dumerilii* (Duges) a paedogenetic Mexican salamander endemic to Lake Patzcuaro, Michoacán. *Copeia*. 1970: 385-388.
- Bradford, D F, Graber, D.M y Tabatabai, F.** 1994. Population declines of the native frog, *Rana muscosa*, in Sequoia and Kings Canyon National Parks, California. *Southwestern Naturalist*. 39:323-327.
- Calderón, S.I y Rodríguez, D.T.** 1986. Estado actual de las especies del género *Ambystoma* (Amphibia: Caudata) de algunos lagos y lagunas del Eje Neovolcánico Central. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM, pp 55.
- Carey, C y Alexander, M.** 2003. Climate change and amphibian declines: is there a link? *Diversity and Distributions*. 9: 111-121.

Casas-Andreu y Aguilar-Miguel, X. 1997. La polémica sobre la declinación mundial de poblaciones de anfibios. *Ciencia ergo sum*. 4(1): 97-102.

Casas-Andreu, G, Cruz, A. R y Aguilar-Miguel, X . 2003. Un regalo poco conocido de México al mundo: el ajolote o axolotl (*Ambystoma*: Caudata: Amphibia). Con algunas notas sobre la crítica situación de sus poblaciones. *Ciencia ergo sum*. 10: 304-308.

Collins, J.P y Storfer, A. 2003. Global amphibian declines: Sorting the hypotheses. *Diversity and distributions*. 9: 89-98.

Contreras, R.E. 2006. Distribución potencial del “*Ambystoma mexicanum*” en los canales de la zona chinampera de Xochimilco. Tesis de licenciatura. Instituto de Biología, UNAM, pp 49.

Daszak, P, Cunningham, A.A y Hyatt, A.D. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and distributions*. 9: 141-150.

De la Rosa, B.J. 2006. La contaminación del Lago de Xochimilco por aguas negras y su influencia en la agricultura local. Tesis de licenciatura. Facultad de Filosofía y letras, UNAM.

Flores, V.O, Mendoza, Q.F y Gracia, G.P. 1995. Recopilaciones de claves para la determinación de anfibios y reptiles de México. *Publicaciones especiales del Museo de Zoología*. Universidad Nacional Autónoma de México. 10: 68.

Gardiner, D.M y Hoppe, D. M. 1999. Environmentally induced limb malformations in mink frogs (*Rana septentrionalis*). *Journal of Experimental Zoology*. 284: 207-216.

Gilbert, S. F. 2003. Developmental biology. Massachusetts: Sinauer Associates. pp 817 .

Google 2009 en:

www.googleearth.com.

González, R.E. 2006. Evaluación in situ del efecto biológico de metales pesados en el ajolote *Ambystoma mexicanum*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, pp 74.

Graue, W. V. 1998. Estudio genético y demográfico de la población del anfibio *Ambystoma mexicanum* (Caudata: Ambystomatidae) del lago de Xochimilco. Tesis de Doctorado. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, pp 108.

Hatch, A.C. y Blaustein, A.R. 2003. Combined effects of the UV-B radiation and nitrate fertilizer on larval amphibians. *Ecological Applications*. 13: 1083–1093.

Hernández, F. 1548. Resum Medicarum, Noval Hispaniel seu Plantarum, Animalium, Mineralium. *Mexicanorum Historia*.

Huacuz, E.D. 2002. Programa de conservación y manejo de *Ambystoma dumerilii* "EL ACHOQUE DEL LAGO DE PÁTZCUARO". Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza y Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. pp

INFRA 2007 en:

http://72.14.209.104/search?q=cache:JquLEzq8rRoJ:www.infra.com.mx/infragases/docs_pdf/dot2006_pdf/nitrogeno.pdf+nitrogeno+como+cancerigeno&hl=es&ct=clnk&cd=5&gl=mx

IUCN. 2007. *Red List of Threatened Species* en :

www.iucnredlist.org

Johnson, P.T.J, Lunde, K. B, Thurman, E.M, Ritchie, E.G, Wray, S.W, Sutherland, D.R, Kapfer, J.M, Frest, T.J, Bowerman, J y Blaustein, A.R.. 2002. Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. *Ecological Monographs*. 72:151-168.

Juárez- Figueroa L, Silva-Sánchez A, Uribe-Salas y Cifuentes-García, E. 2003. Microbiological indicators of wáter quality in the Xochimilco Canals, México City. *Salud publica de México*. 45: 389-395.

Kirk, J.J. 1998. Western spotted frog (*Rana pretiosa*) mortality following forests spraying of DDT. *Herpetological review*. 19: 51-53.

Lips, K. R, Green, E, Papendick, R. 2003. Chytridiomycosis in Wild Frogs from Southern Costa Rica. *Journal of Herpetology*. 37: 215–218.

Marco, A y Blaustein, A. R. 1999. The effects of nitrite on behavior and metamorphosis in cascades frogs (*Rana cascadae*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18: 946-949.

Marco, A, Quilchano, C. y Blaustein, A. R. 1999. Sensitivity to nitrate and nitrite in pond-breeding amphibians from the Pacific Northwest. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18: 2836-2839.

Martín del Campo y Sánchez, R. 1936. Los batracios y reptiles según los códices y relatos de los antiguos mexicanos. *Anales del Instituto de Biología*. UNAM.7: 489-512.

Matías, F.N. 2006. Diferenciación genética y sistemática de las especies *Ambystoma altamiranoi*, *A. leorare*, *A. rivulare* y *A. zempoalaense*. Tesis de Maestría. Instituto de Biología, UNAM, pp 66.

Mendenhall, W y Sincich, T. 1997. Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. México. Prentice Hall, pp 1182.

Norma Oficial Mexicana, NOM-127-SSA1-1994. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Pesca. Salud ambiental, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad

ytratamiento a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación, 22 noviembre, pp 79.

Norma Oficial Mexicana. NOM-059-ECOL-2001. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Pesca. 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, 6 marzo, pp 65.

Ortiz, M, Marco A, Saiz N y M. Lizana. 2004. Impact of ammonium nitrate on growth and survival of six european amphibians. *Environmental Contamination and Toxicology*. 47:234-239.

Petranka, J.W, Eldridge, M.E y Haley, K.E. 1993. Effects of timber harvesting on southern appalachian salamander. *Conservation Biology*.7: 363-370.

Pounds, J. A, Fogden, M.P. L y Campbell. J.H.1999. Biological response to climatic change on a tropical mountain. *Nature*. 398: 611-614.

Ramírez-Bautista, A, Hernández-Salinas, U, García-Vázquez, U, Leyte-Manrique, A y Canseco-Marquez, L. 2009. Herpetofauna del Valle de México: Diversidad y Conservación. Conabio, pp 213.

Ryczel, M. E. 2006. Presencia en el agua de bebida de nitratos y nitritos y su impacto sobre la salud. *ATA INFORMA*. 71: 24-26.

Roldán, I y Bojórquez, L. 1995. Descripción cuantitativa de los cambios del área lacustre en el sur de la Cuenca de México. Ponencia presentada en el Primer Seminario Internacional de Investigadores de Xochimilco, Tomo 1, pp. 260-270.

Romansic, J.M, Diez, K.A, Higashi, E.M y A.R. Blaustein. 2006. Effects of nitrate and the pathogenic water mold *Saprolegnia* on survival of amphibian larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*. 68: 235-243.

Seoánez, C.M. 1999. Aguas residuales, tratamiento por humedales artificiales. Fundamentos científicos, tecnología y diseño. España: Mundi-Prensa, 73 pp.

Shaw, G. 1798. *Gyrinus mexicanus* Shaw. *Naturalist's Miscellany*. 9: 343-344.

Schuytema, G.S y Nebeker, A.V. 1999. Comparative effects of ammonium and nitrate compounds on pacific treefrog and african clawed frog embryos. *Environmental Contamination and Toxicology*.36:200-206.

Stewart, M.M. 1995. Climate driven population fluctuations in rain forest frog. *Journal of herpetology*. 29: 437-446.

Storfer, A. 2003. Amphibian declines: future directions. *Diversity and distributions*. 9: 151-163.

UNESCO, 2006. Proyecto Unesco Xochimilco. Un proceso de gestión participativa, México, D.F.

Valiente, R. E. 2006. Efecto de las especies introducidas en Xochimilco para la rehabilitación del hábitat del ajolote (*Ambystoma mexicanum*). Tesis de Maestría. Instituto de Biología, UNAM. pp 94.

Zambrano, L, Reynoso, V. H y Herrera, G. 2004. Abundancia y estructura poblacional del axolotl (*Ambystoma mexicanum*) en los sistemas dulceacuícolas de Xochimilco y Chalco. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Base de datos SNIB-Conabio proyecto AS004. México, D.F.

Zambrano, L. E, Vega, L, Herrera, G, Prado, E y V. H Reynoso. 2007. A population matrix model and population viability analysis to predict the fate of endangered species in highly managed water systems. *Animal Conservation*, 10:297-303.

Zambrano, L. E, Contreras, V, Mazari-Hiriart, M y Zarco-Arista, A. E. 2009. Spatial heterogeneity of water quality in a highly degraded tropical Freshwater ecosystem.. *Environmental management*. 43: 249-263.

Zar, J.H. 1999. Biostatistical analysis. New Jersey. Prentice Hall, pp 123.

APENDICE I

Apareamiento y desarrollo embrionario de *Ambystoma mexicanum*.

La reproducción comienza cuando el macho estimulado deposita un espermátforo (resultado de la secreción de las glándulas cloacales), el cual tienen la forma de un cono gelatinoso con el esperma en la punta. Posteriormente, la hembra lo introduce en su cloaca y los espermatozoides son expulsados en el momento del desove, de manera que unos cuantos choquen con la superficie de cada huevo en el camino hacia la cámara cloacal de la hembra (aproximadamente cada hembra desova un promedio de 800 huevos) (Graue, 1998).

El desarrollo embrionario de un vertebrado comienza por la fecundación, en la cual se reestablece la diploidia al fusionarse los pronúcleos masculinos y femeninos. Posteriormente empieza la segmentación, la cual es una serie de divisiones mitóticas rápidas y consecutivas donde existe una alteración de la relación núcleo/citoplasma; por lo que, existe un patrón diferenciado en la distribución del vitelo, que en el caso de los anfibios, da por resultado el huevo denominado mesolécito. Este tipo de huevo tiene una gran cantidad de vitelo que tiende a concentrarse en el polo vegetativo, mientras que el núcleo se desplaza hacia el polo animal. El tipo de segmentación de un anfibio es la holoblástica desigual en la cual las células resultantes de cada división son independientes y cada una se encuentra rodeada de su propia membrana. A partir de la primera división a cada célula que forma parte del embrión se le llama blastómero. En este tipo de segmentación la tercera división es latitudinal en la cual se forman 8 blastómeros desiguales, resultando en una mórula con un polo animal formado por muchas células pequeñas y un polo vegetativo con pocas células y grandes. La segmentación en general produce una masa de células llamada blástula, la cual puede crecer llamándose a este tipo celoblástula que en el caso de los anfibios es irregular. Después de la segmentación sigue la gastrulación en la cual se originan las tres capas blastodérmicas y se establece el plano corporal básico y debido al movimiento de células se permite las interacciones entre células antes lejanas y se determina la neurulación y la organogénesis. Hay varios tipos de gastrulación, pero en los anfibios se lleva a cabo la gastrulación por invaginación, en la cual las células del polo vegetativo se pliegan hacia dentro y se introducen hacia el blastocele. De esta forma se crea una cavidad rodeada por ectodermo que se llama arquenterón del cual se originará el futuro tubo digestivo. El poro de entrada al arquenterón se llama blastoporo y dependiendo del posterior desarrollo, el blastoporo dará lugar al ano, la boca o se cerrará. Durante este proceso se forman dos capas germinales, la más externa es el ectodermo (que dará lugar al epitelio de la superficie corporal y al

sistema nervioso) y la más interna, que constituye el arquenterón, es el endodermo (que formará el epitelio del tubo digestivo). Las evaginaciones del arquenterón forman el mesodermo (tercera capa embrionaria que formará el sistema muscular y reproductor) (Gilbert, 2003).

Particularmente en *A. mexicanum*, el desarrollo embrionario se completa en 43 etapas con una duración en total de aproximadamente 15 días, dando por resultado individuos con una talla aproximada de 1 cm (Graue, 1998).

Las figuras que se presentan en este anexo fueron de gran utilidad para la realización de este trabajo, debido a que las imágenes que se obtuvieron como resultado se pudieron contrastar con las ilustraciones del desarrollo embrionario de *A. mexicanum* publicadas por Armstrong *et al.*, (1989) las cuales se muestran en las figuras 10 a la 15.

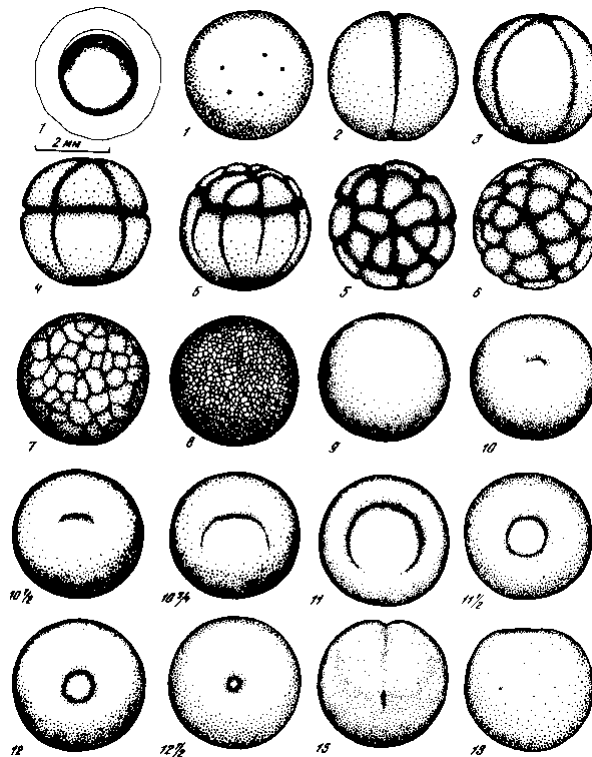


Figura 10.

(1).- huevo fertilizado y activado: el espacio perivitelino se ha formado, (2) - primera aparición de la primera línea de segmentación en el polo animal. Hay dos células, (3) 4 células, (4) 8 células, (5) 16 células, (6) 32 células, (7) 64 células, (8) blástula temprana. Final del índice mitótico en los blastómeros animales, (9) blástula tardía (epitelial); la superficie es lisa, (9 ½) comienza la función morfogénica del núcleo, (10) gástrula temprana I: primeros signos del labio dorsal del blastoporo, (10 ½) gástrula temprana II: la invaginación continua. El blastoporo está casi horizontal en un cuadrante, (10 ¾) gástrula media I: el labio dorsal forma un semicírculo, (11) gástrula media II: el blastoporo cubre tres cuadrantes. Los labios laterales están formados; el labio ventral está marcado sólo por acumulación de pigmentos la yema alcanza su máximo diámetro, (11 ½) gástrula tardía I: el blastoporo es circular; la

invaginación continúa, (12) gástrula tardía II: el blastoporo tiene una forma oval o circular, (12 ½) gástrula tardía III: el blastoporo oval se esta cerrando, (13 -) blastoporo con una hendidura; las líneas de la placa neural no se distinguen, (13) neurula temprana I: el blastoporo es una hendidura vertical estrecha; una hendidura en la línea media de la placa neural; las líneas divisorias de las placas neurales apenas son notorias, pero los pliegues neurales todavía no están por encima de la superficie del embrión; el lado dorsal esta ligeramente aplanado.

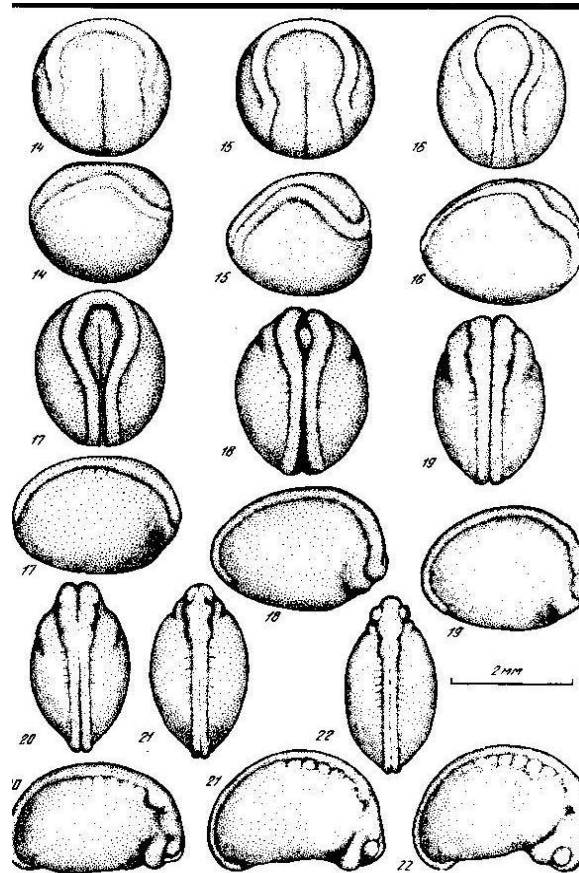


Figura 11.

(14) neurula temprana II: la placa neural es amplia. Los pliegues neurales son notorios y comienzan a levantarse por encima de la superficie en la región de la cabeza. El embrión esta ligeramente alargado, (15) neurula temprana III: la placa neural tiene una forma de escudo. Los pliegues neurales se han elevado y bordean a las regiones de la placa neural, (16) neurula media: los pliegues neurales se hacen más altos, la región espinal de las hendiduras de la placa neural y la placa en total empiezan a hundirse, (17) neurula tardía I: los pliegues neurales son más altos, especialmente en la región de la cabeza; con una estrechez posterior y profundización de la placa neural, en las regiones de la cabeza y espinal. Surco hiomandibular limita el arco mandibular y es apenas aparente. Empieza la segmentación del material del mesodermo. Hay 2 pares de somitas, (18) neurula tardía II: la placa neural esta profundamente hundida. Los pliegues neurales se empiezan a cerrar y están especialmente altos en la región de la cabeza, donde tres ligeros bultos correspondientes a las vesículas del cerebro están delineada. Los pliegues neurales de la región espinal están casi en contacto el surco hiomandibular esta más marcado. Hay 2 pares de somitas, (19) neurula tardía III: los pliegues neurales están en contacto pero no se han fusionado aún, la curvatura del cerebro es bastante distintiva de perfil, las vesículas del cerebro anterior, medio y posterior también son distintas. El abultamiento de las vesículas ópticas esta delineado, el surco mandibular es más profundo, hay dos pares de somitas, (20) neurula tardía IV: los pliegues neurales están fusionados en la región espinal; en la región cerebral sólo hay contacto, las vesículas ópticas son distintas y se están volviendo más grandes. Aparecen surcos en el ectodermo a nivel del cerebro posterior un ligero

abultamiento marca la futura región de las agallas. El arco mandibular se vuelve prominente y cuatro pares de somitas están presentes, (21) los pliegues neurales están completamente fusionados, el límite posterior de la región de las agallas es más claro, el pronefros es visible como un muy ligero abultamiento y 4 pares de somitas están presentes. el lado ventral del embrión se encuentra ligeramente cóncavo. La región de la cabeza se curva hacia abajo desde el arco mandibular, el lado dorsal forma un semicírculo, las curvaturas occipital y parietal del cerebro son aparentes, (22) la región de las agallas y el pronefros son más claros la yema de la cola se marca ligeramente y de 5 a 6 pares de somitas están presentes. El lado ventral del embrión se vuelve más cóncavo, conforme la curvatura de la cabeza se incrementa hacia abajo.

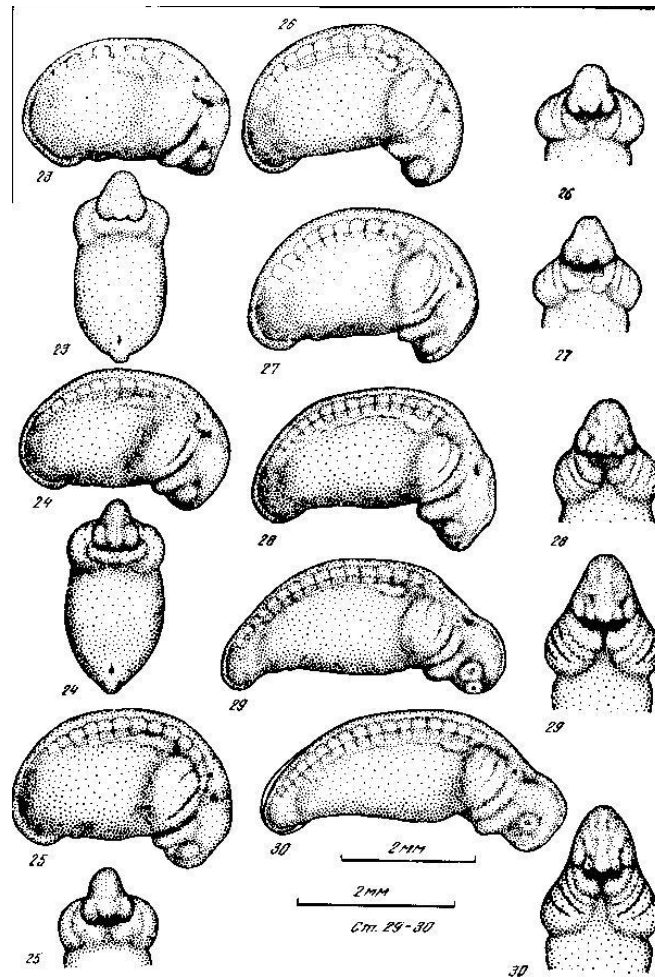


Figura 12.

(23) el primordio del oído se marca como una depresión profunda en el ectodermo en la región por encima del futuro arco oideo. En la región dorsal del abultamiento de las agallas el surco hiobranquial aparece delineando los límites entre el arco ioideo y el primer arco branquial, (24) el foso del oído es más claro. El surco hiobranquial se continua alargando centralmente. El abultamiento pronefrico esta claramente delineado y ambos, el pronefros y el comienzo del ducto pronefrico son claramente visibles. 8 o 9 pares de somitas están presentes, (25) el abultamiento de las agallas continua y el surco hiobranquial comienza alargarse. El primer surco branquial aparece ligeramente delineado en la región dorsal del abultamiento de las agallas. la yema de la cola es aún pequeña; 9 pares de somitas están presentes. El cuerpo del embrión continúa alargándose; el lado ventral es más cóncavo, la curvatura de la cabeza hacia abajo se incrementa, (26) el foso del oído es claramente distinto, el primer surco branquial es más largo y

mas marcado. la región de las agallas es grande con un abultamiento delineado claro, la parte más alta de este abultamiento esta acentuada por un surco profundo formado entre este y el pronefros en desarrollo. El ducto pronefrico es visible a traves de 6 somitas. el primordio del órgano olfatorio aparece como un tubérculo en la parte anterior de la cabeza. la yema de la cola gradualmente se agranda. El cuerpo del embrión se estira. Hay de 10 a 11 pares de somitas, (27) el surco branquial aparece ligeramente en la parte dorsal del abultamiento agallal. 12 pares de somitas están presentes, (28) el cuerpo del embrión se sigue aumentado y se alcanza la máxima curvatura hacia debajo de la cabeza. El foso olfatorio esta claramente delineado enfrente del ojo y 14 pares de somitas están presentes, (29) el cuerpo del embrión empieza a enderezarse visible sólo por una curvatura menor de la cabeza. La yema de la cola se engrandece. 16 pares de somitas están presentes, (30) la cabeza continúa enderezándose y la curvatura dorsal se reduce. El cuerpo se alarga y la yema de la cola también. El pliegue de la aleta aparece por primera vez el pliegue de la aleta dorsal aparece en la somita 14.

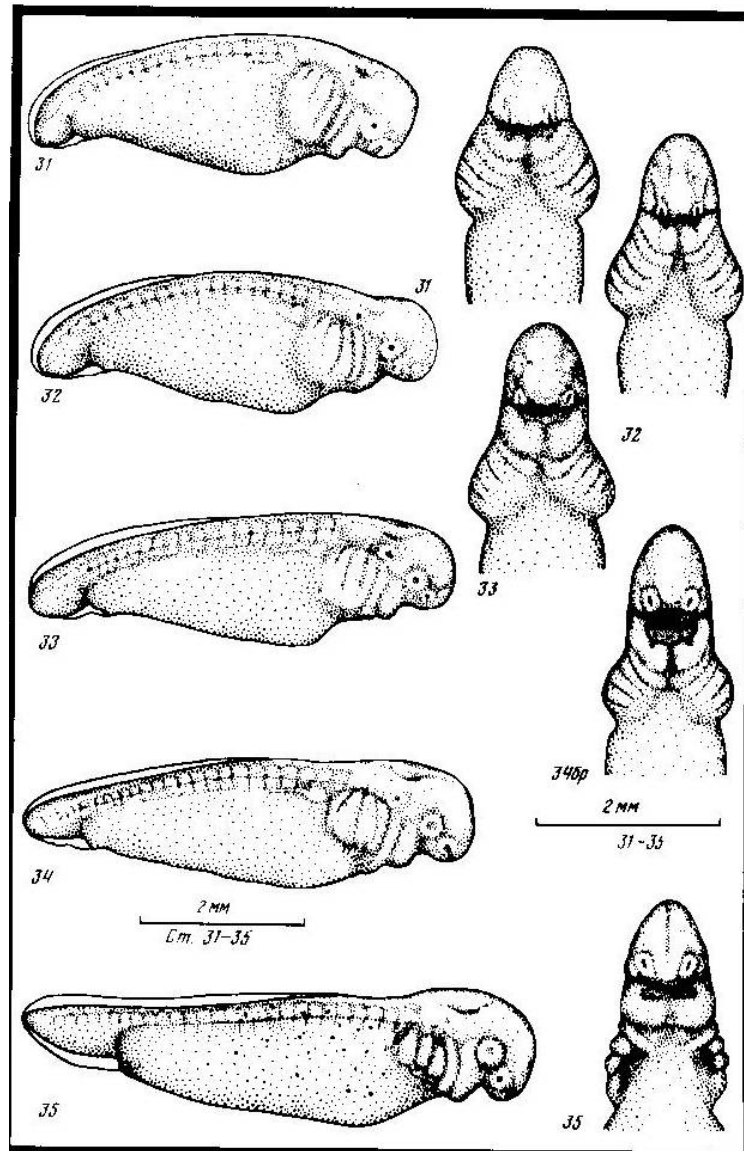


Figura 13.

(31) hay 19 pares de somitas. Un surco aparece en la región de los primordios oculares. El tercer surco branquial es aparente en la parte dorsal de la región de las agallas. El pliegue de la aleta dorsal empieza

en la somita 2, (32) hay 20 pares de somitas, la aleta dorsal aparece en la somita 10, (33) hay de 21 a 22 pares de somitas . La aleta dorsal empieza en la somita 8, (34) hay de 24 a 25 pares de somitas. La aleta dorsal empieza en la somita 7, (35) a partir de esta etapa el eje corporal desde el cerebro posterior hasta la base de la cola es muy recto. 3 agallas externas se muestran como nódulos en la superficie del abultamiento de las agallas. La línea lateral alcanza a la 6° somita. La aleta dorsal empieza en la 5° somita. Los primeros cromatóforos aparecen; la pulsación del corazón empieza. Las somitas ahora son difíciles de contar.

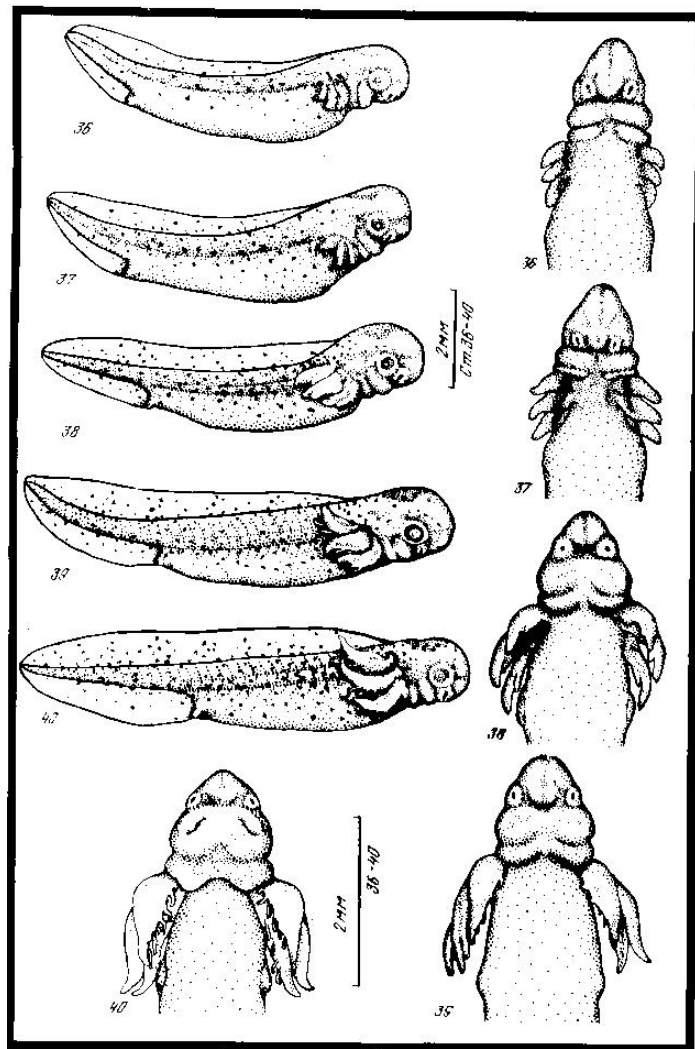


Figura 14.

(36) las agallas externas son pequeños brotes directamente al lado del surco de las agallas, (37) las agallas se alargan y se empujan ventro-posteriormente. Aún no son visibles las yemas de las extremidades, (38) los brotes de los filamentos aparecen como dos nódulos en cada agalla. El primordio del opérculo es visible como un pliegue sobre el arco ioideo. Ninguno de los dos rudimentos del opérculo alcanzan la línea media. Las yemas de las extremidades están ligeramente marcadas, (39) la

primera agalla tiene dos pares de brotes de filamentos; la segunda y la tercera tienen 3 pares cada uno. las agallas cubren las yemas de las extremidades. Ambos rudimentos del opérculo se aproximan a la línea media. Los ángulos de la boca empiezan a mostrarse, (40) las agallas son grande y el número de filamentos se incrementa. en la 1° agalla hay 4 pares en la 2° y 3° hay 6 o 7. Los rudimentos del opérculo se unen en la línea media. los ángulos de la boca están mascados más claramente. Las yemas de las extremidades se empiezan a desarrollar.

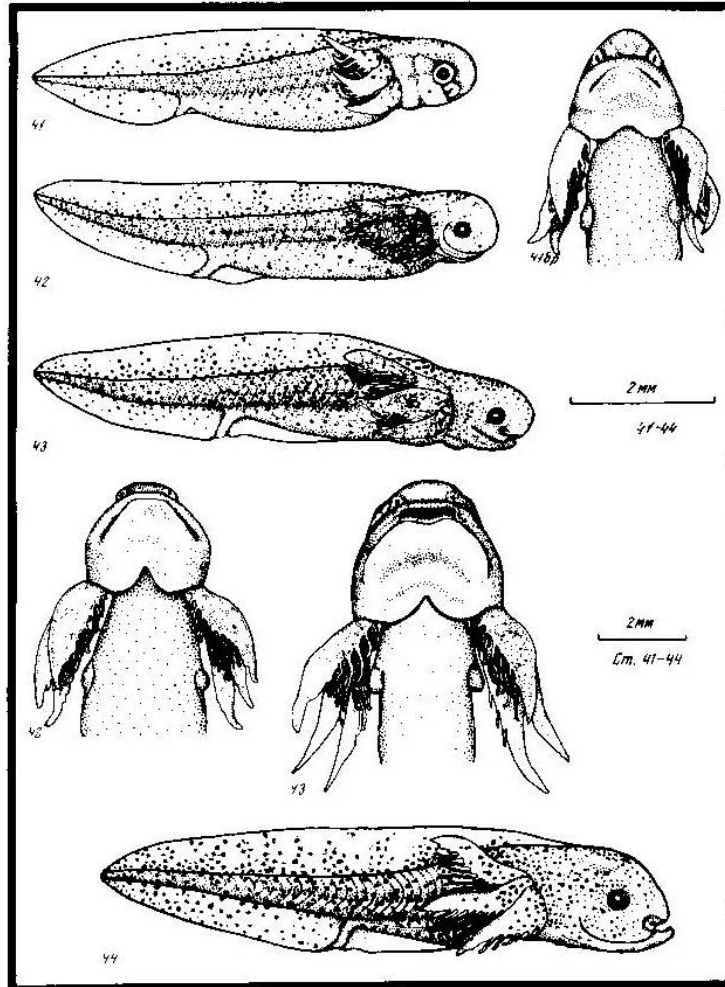


Figura 15.

(41) las agallas continúan elongándose. El número de filamentos se incrementa y se vuelven más grandes la boca esta delineada claramente. La segunda línea lateral corre a través del flanco hacia la yema de la extremidad y la rodea en su lado ventral. Las yemas de las extremidades anteriores siguen aun pequeñas. La eclosión comienza,

(42) las agallas se extienden más allá de las yemas de las extremidades anteriores. La boca esta completamente delineada pero no se ha roto todavía,

(43) la boca esta completamente abierta,

(44) ajolote recién eclosionado.

Curvamiento de cola

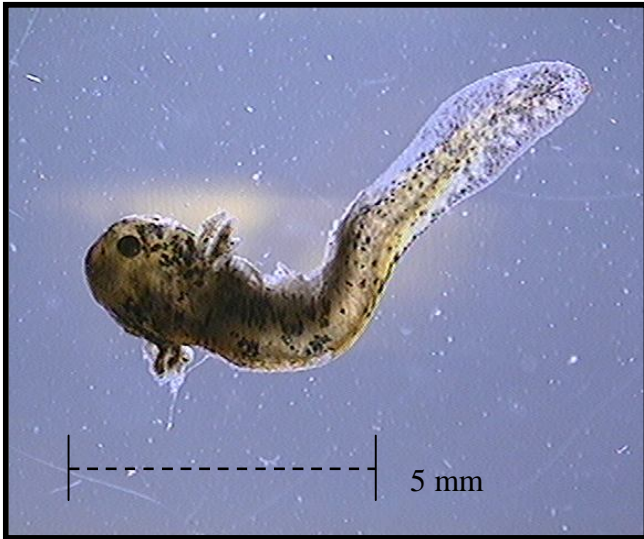


Figura 16. Organismo recién eclosionado de *A. mexicanum* con un curvamiento en espina dorsal. La flecha indica la desviación.

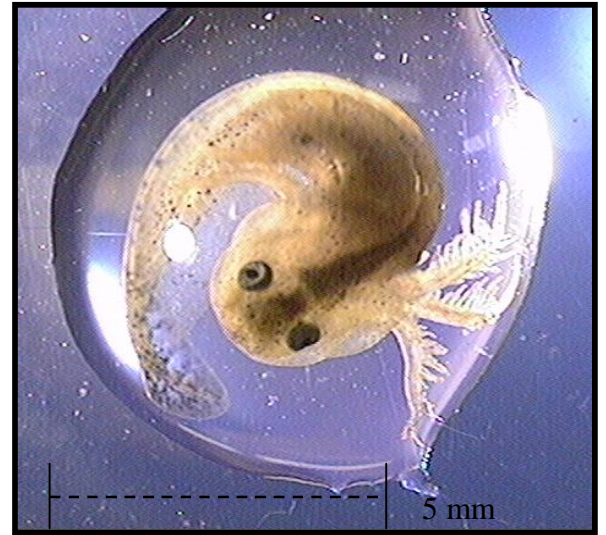


Figura 17. Organismo recién eclosionado de *A. mexicanum* en posición dorsal con curvamiento de cola.

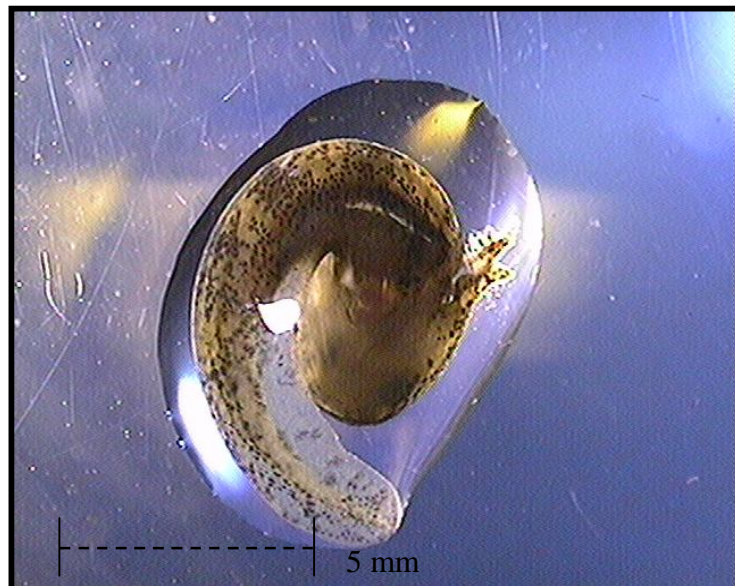


Figura 18. Organismo recién eclosionado de *A. mexicanum* en posición ventral, en el cual se aprecia un curvamiento de cola.

Ausencia de cola

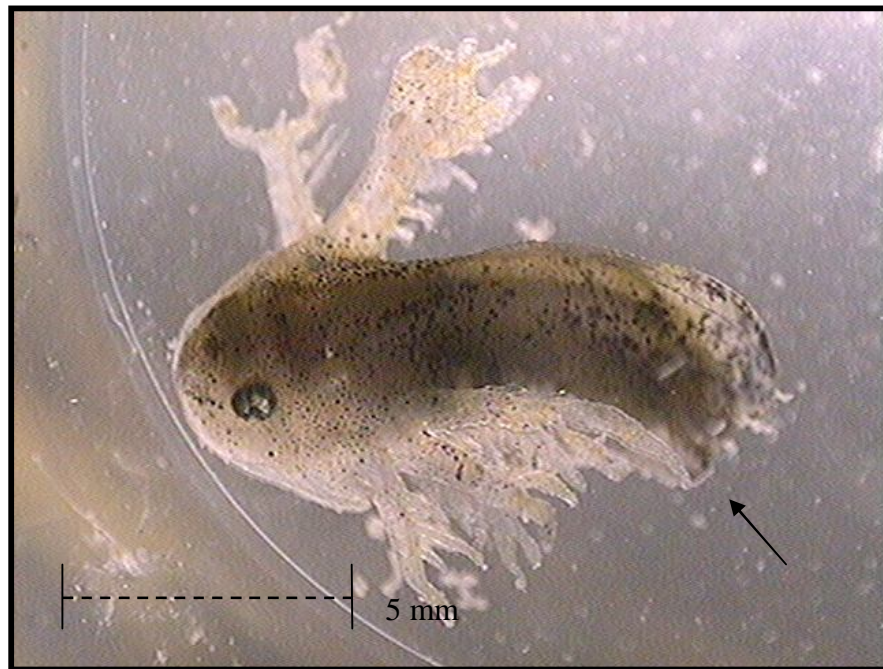


Figura 19. Organismo recién eclosionado de *A. mexicanum* con ausencia de cola. La flecha indica el lugar de la anomalía.

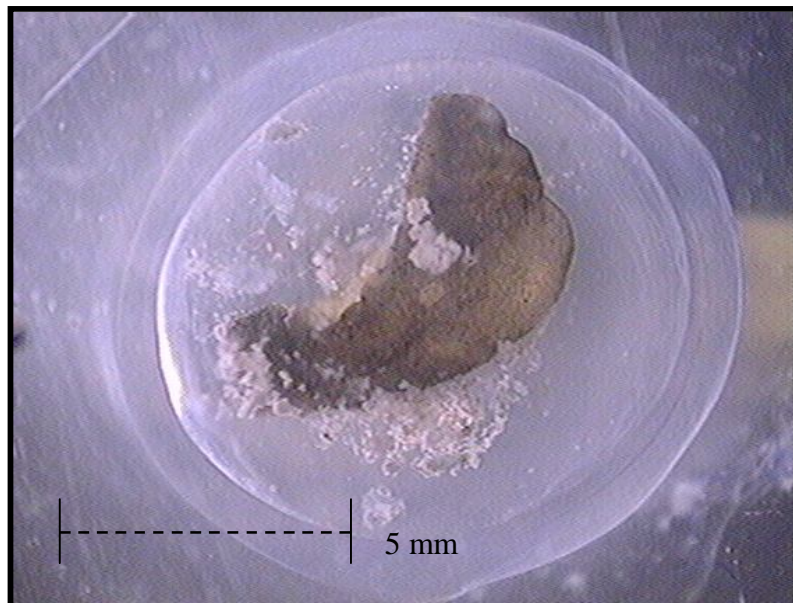


Figura 20. Embrión de *A. mexicanum*. En la parte ventral del organismo se observa una gran porción de tejido inflamado, por lo que se considera edema.



Figura 21. Embrión de *A. mexicanum*. Se observa la presencia de líquido en las porciones costales del cuerpo.



Figura 22. Embrión *de A. mexicanum*. Se aprecian múltiples malformaciones en el cuerpo (edemas y ausencia de desarrollo).

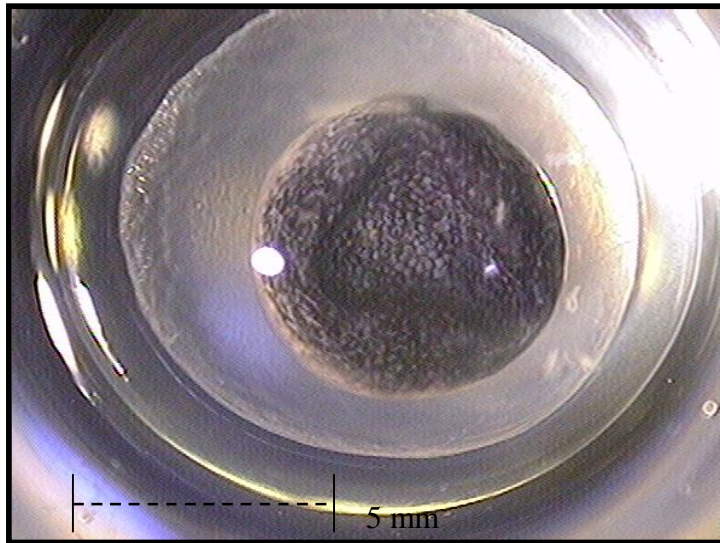


Figura 23. Embrión de *A. mexicanum*, expuesto a amonio a una concentración de 0.25 mg/l. El último estadio de desarrollo que alcanzo fue el 16. La flecha indica la posición de los pliegues neurales, los cuales se ven más altos y por lo tanto son característicos del estadio.



Figura 24. Embrión de *A. mexicanum*. El último estadio de desarrollo que alcanzo fue el 36. La flecha indica los brotes de las branquias.

APENDICE IV. Las longitudes de los organismos eclosionados en cada experimento se presentan en las tablas 5 a 11.

Tabla 5. Valores de longitud en el primer experimento con concentraciones de 0.1 mg/l de amonio, 0.1 mg/l de nitrito y 0.1 mg/l de nitrato.

Núm. de organismos	Experimento testigo	Testigo 1	Testigo 2	Testigo 3	Experimento nitrito	Nitrito 1	nitrito 2	nitrito 3	Experimento. nitrato	Nitrato 1	Nitrato 2	Nitrato 3	Experimento. Amonio	Amonio 1	Amonio 2	Amonio 3
1	14.86	15.1	14.5	15.24	14.25	13.87	14.74	14.85	12.42	13.6	13.49	14.05	14.02	13.93	12.81	12.56
2	13.94	15.53	15.26	14.29	14.23	14.79	14.78	14.12	12.07	13.94	14.69	13.93	13.73	12.91	13.69	12.3
3	14.85	15.57	13.96	14.01	15.07	14	14.88	14.79	13.94	14.6	14.64	14.72	13.87	13.82	13.54	12.38
4	14.4	15.67	15.24	16	13.75	12.74	15.42	14.41	14.1	13.84	14.11	13.83	13.93	13.7	13.31	13.09
5	14.16	15.47	15.3	14.62	13.72	13.54	14.39	14.5	14.33	14.9	14.06	15.9	13.5	14.49	13.55	11.51
6	13.81	14.84	14.06	14.56	11.5	14.41	14.51	13.85	14.5	14.69	14.58	15.13	13.89	13.25	14.03	12.3
7	14.12	15.88	14.59	12.74	12.78	13.4	14.95	14.43	13.17	14.87	14.14	15.48	13.96	13.47	14.2	12
8	15.21	15.2	14.58	13.98	14.55	13.53	16.32	16.06	15.28	14.27	14.36	14.99	14.16	14.2	13.4	11.91
9	14.54	15.06	14.05	14.88	13.7	13.05	15.34	14.39	14.89	13.7	15.17	14.34	13.89	13.91	13.09	12.39
10	14.75	14.09	14.72	14.78	15.08	12.65	14.46	14.66		14.3	14.6	14.98	14.3	14.35	13.21	12.58
11	15.48	15.82	14.51	13.58	14.61	14.38	15.05	14.4		14.79	14.06	14.33	14.1	13.53	14.05	11.81
12	15.44	15.61	15.65	14.6	13.34	13.5	15.36	15.8		14.48	14.52	15.06	14.29	13.58	13.4	12.14
13	14.67	15.5	14.75	14.29	16.21	14.54	15.06	15.02		15.08	12.37	14.56	13.82	14.46	13.4	12.21
14	14.33	14.63	13.94	13.48	15.24	14.16	15.04			14.99		14.09	13.73	14.48	13.32	
15	14.28	15.65	14.75	15.81	14.8	13.29	13.81			14		12.10	14.1	14.12	13.85	
16	14.47	14.71	15.43	14.45	14.29	14.27	15.55			14.95		15.56	13.66	13.94	13.25	
17	14.8	15.43	14.36	15.19	14.51	13.52	16.08							13.27	14.11	
18	15.1	15.85		15.49	15.4	13	14.98							13.99	13.39	
19	14.87				14.62	13.93	16.05							13.87	13.24	
20	14.11				14.36	13.7	15.65								13.33	

Tabla 6. Valores de longitud en el segundo experimento con concentraciones de 0.2 mg/l de amonio, 0.2 mg/l de nitrito y 0.3 mg/l de nitrato.

Núm. de organismos	Experimento testigo	Testigo 1	Testigo 2	Testigo 3	Experimento nitrito	Nitrito 1	nitrito 2	nitrito 3	Experimento. nitrato	Nitrato 1	Nitrato 2	Nitrato 3	Experimento. Amonio	Amonio 1	Amonio 2	Amonio 3
1	12.8	14.1	14.01	14.66	13.16	12.83	13.14	13.78	13.49	13.36	11.86	11.58	13.32		14.08	13.32
2	13.05	14.16	13.88	12.08	12.74	14.56	14.04	12.81	13.13	12.86	12.69	13.15	12.73		13.49	12.33
3	14.63	14.59	13.85	13.74	13.2	12.32	11.27	12.78	13.94	11.83	13.75	13.13	13.09		12.54	12.77
4	15.28	14.19	14.52	12.22	13.66	11.87	12.5	13.03	14.23	13.55	11.87	12.16	12.84		11.17	11.1
5	14.31	13.75	14.14	14.01	13.83	12.06	12.54	12.68	14.09	13.92	12.73	12.14	13.23		13.88	
6	14.5	14.01	13.91	13.59	14.14	13.56	11.9	12.24	13.37	10.79	11.94	12.59	12.72		12.37	
7	14.41	14.18	14.42	13.16	10.59	12.16	11.18	12.88	12.18	14.89	13.52	13.03	12.9		10.89	
8	14.4	14.38	15.12	13.19	12.8	13.26	12.71	14.58	12.01	12.45	14.4	13.2	12.71		12.84	
9	14.16	13.9	14.35	13.05	13.61	13.62	13.24	11.54	13.55	13.83	12.37	12.19			13.6	
10	14.38	12.7	13.89	13.05	13.98	12.02	13.57	12.63		11.38	12.08	12.75				
11	14.09	14.36	12.97	14.16	11.95	13.06	13.07	11.71		13.26	14.26	13.5				
12	14.38		14.21	14.57	13.45		14.07	12.4		13.33	14.35	13.6				
13	14.29		14.57	14.43			12.38				14.31	12.86				
14	14.33		13.68	14.36							11.86	12.29				
15	14.57		14.32	13.6								12.32				
16	14.74		13.24	13.55												
17	14.59		12.93													
18	13															
19																
20																

Tabla 7. Valores de longitud en el tercer experimento con concentraciones de 0.25 mg/l de amonio, 0.25 mg/l de nitrito y 0.5 mg/l de nitrato.

Núm. de organismos	Experimento Testigo	Testigo 1	Testigo 2	Testigo 3	Experimento nitrito	Nitrato 1	nitrito 2	nitrito 3	Experimento nitrato	Nitrato 1	Nitrato 2	Nitrato 3	Experimento Amonio	Amonio 1	Amonio 2	Amonio 3
1	12.4	12.82	12.02	12.66	13.93	13.7	14.5	14.54	14.89	15.04	14.94	14.16	9.91	9.46	12.2	12.21
2	12.2	14.35	12.44	12.6	13.61	12.84	15.11	13	14.75	15.43	14.13	14.04	10.6	8.94	12.89	12.72
3	12.4	12.76	12.58	13.46	12.29		12.28	12.98	14.1	14.57	13.88	16.05	10.29		13.82	12.4
4	11.89	14.19	12.17	13.44			11.48		14.75	15.94	14.97	14.65	11.34		12.33	13.36
5	12.8	13.95	12.67	13			12.47		14.63	14.83	15.1	15.04				11.63
6	12.9	14.34	11.76	12.44					14.13	15.98	14.74	14.93				
7	13.02	12.85	11.38	11.67					14.97	15.21	14.09					
8	12.26	14.5	12.87	13.74					14.77	14.96	15.53					
9	12.21	13.7	12.48	12.84					14.32	15.96	15.19					
10	12.73	14.6	12.17	14.6					14.05	15.07	15.38					
11	13	13.49	11.45	13.27					14.93	14.54	13.56					
12	12	12.8	12.29	13.2					13.96	15.08	15.94					
13	12.06	13.02	12.7	12.7					15.11	14.09	13.99					
14	13.1	14.25	12.52	13.37					15.87	15.72	15.48					
15	12.65	12.89	12.44						13.98	14.23	15.08					
16	13.4		12.4						15.18	15.03	13.58					
17	11.98								13.79	15.18	15.04					
18									13.75	15.37	15.1					
19									14.96	15.21	14.97					
20									15.24	15.38	14.02					

Tabla 8. Valores de longitud en el cuarto experimento con concentraciones de 0.3 mg/l de amonio, 0.3 mg/l de nitrito y 2 mg/l de nitrato.

Núm. de organismos	Experimento testigo	Testigo 1	Testigo 2	Testigo 3	Experimento nitrito	Nitrito 1	nitrito 2	nitrito 3	Experimento nitrato	Nitrato 1	Nitrato 2	Nitrato 3	E. Amonio	Amonio 1	Amonio 2	Amonio 3
1	14.66	12.26	13.2	13.52	11.71	10.55	12.68	11.96	13.17	11.21	12.4	12.92	11.37	12.02	11.45	11.64
2	12.08	12.67	11.74	12.17	9.91	9.92	10.09	12.56	12.64	13.3	11.9	12.95	11.35	11.76	12.19	11.57
3	13.74	12.89	12.08	12.59	10.13	9.8	12.23	11.52	11.99	12.1	12.2	12.18	9.92		11.65	11.94
4	12.22	12.81	12.46	12.96	10.76	11.89	12.24	11.8	11	13.05	11.82	12.36	12.74			1095
5	14.01	13.11	11.71	13.67	11.58	12.69	11.28	10.77	13.14	12.55	10.81	10.95				
6	13.59	13.13	13.3	10.95	10.49	12.15	11.69	11.46	17.49	13.02	12.58	13.51				
7	13.16	12.91	10.73	12.18	10.41	10.02	9.54	11.03	13.19	12.86		13.43				
8	13.19	13.43	10.1	13.68	11.15	12.24	10.9		13.07	12.8		13.63				
9	13.05	13.65	13.26	11.25	11.89	12.18			13.13	9.74		11.58				
10	13.05	13.82	13.3	14.09	10.67	11.94			12.66	12.96						
11	14.16	13.18	13.17	12.71					13.85	11.52						
12	14.57	13	12.91	11.93					13.21	13.37						
13	14.43	13.27	13.85	12.54					12.2	13.09						
14	14.36	11.93	12	11.79					12.33	11.58						
15	13.6	12.3	12.55	10.85					13.93							
16	10.79	12.48	13.41	11.67					13.5							
17		13.44	13.32													
18			12.46													
19																
20																

Tabla 9. Valores de longitud en el quinto experimento con concentraciones de 0.35 mg/l de amonio, 0.35 mg/l de nitrito y 4 mg/l de nitrato.

Núm. de organismos	Experimento testigo	Testigo 1	Testigo 2	Testigo 3	Experimento Nitrito	Nitrito 1	nitrito 2	nitrito 3	Experimento nitrato	Nitrato 1	Nitrato 2	Nitrato 3	Experimento amonio	Amonio 1	Amonio 2	Amonio 3
1	13.94	13.51	13.59	14.45	12.23	13.41	11.45	11.8			13.56	12.14	12.62	12.62	12.47	11.08
2	13.46	13.37	13.59	13.86	11.61	10.79	11.91	11.5			11.92			11.52	10.45	
3	13.11	13.09	11.84	12.24	11.45	11.01	11.37	11.45			13.48			11.23	12.33	
4	12.43	12	12.84	12.1	13.03	9.8	11.83	12.04								
5	14.5	13.81	13.17	11.79	10.53	11.88	11.88									
6	14.15	12.6	11.92	11.64	12.03	10.87										
7	13.67	14.15	13.12	12.13		9.95										
8	13.85	11.75	13.04	13.64												
9	13.83	12.05	13.01	11.08												
10	13.98	12.8	13.65	12.99												
11	13.41	12.23	13.91	11.02												
12	12.33	12.4	14.15	11.36												
13	13.79	13.15	13.59	12.38												
14	13.22	13.23	12.55	12.7												
15	13.13	13.94	13.01	12.97												
16	13.12	13.49	13.87	11.55												
17	12.81	13.24		13.25												
18	12.54	13.65		13.74												
19		13.8		13.95												
20																

Tabla 10. Valores de longitud en el sexto experimento con concentraciones de 0.5 mg/l de amonio, 0.5 mg/l de nitrito y 5 mg/l de nitrato.

Núm. de organismos	Experimento testigo	Testigo 1	Testigo 2	Testigo 3	Experimento nitrito	Nitrito 1	nitrito 2	nitrito 3	Experimento nitrato	Nitrato 1	Nitrato 2	Nitrato 3	Experimento amonio	Amonio 1	Amonio 2	Amonio 3
1	15.12	15.46	14.1	15.83	11.75	10.36		11.06	10.04		11.45					
2	14.51	14.86	15.09	14.3	11.05			10.84			13.57					
3	14.49	13.85	16.18	14.68	12.1											
4	14.43	14.35	14.19	16.04	10.11											
5	14.87	15.47	15.65	15.34	13.1											
6	15.01	15.51	15.07	14.52	12.04											
7	14.39	14.97	14.28	14.58	12.01											
8	15	14.63	14.38	14.9												
9	13.48	14.36	12.47	14.84												
10	12.7	14.8	14.55	14.1												
11	12.52	12.5	15.01	15.28												
12	14.59	13.67	14.59	14.09												
13	13.68	12.87	13.05	13.18												
14	13.08		14.8	14.88												
15	14.44		13.33	13.3												
16	15.02		13.35													
17	13.97															
18																
19																
20																

Tabla 11. Valores de longitud en el séptimo experimento con concentraciones de 7 mg/l de nitrato.

Núm. de organismos	Experimento testigo	Testigo 1	Testigo 2	Testigo 3	Experimento nitrato	Nitrato 1	Nitrato 2	Nitrato 3
1	13.08	14.24	14.21	14.11	10.6		10.96	10.19
2	14.18	14.15	13.89	14.82	10.37			11.65
3	15.06	14.13	13.35	14.44	10.99			
4	14.15	14.58	14.82	15.11	9.15			
5	13.67	13.82	13.8	13.99				
6	13.74	13.21	14.04	13.45				
7	14.13	13.92	15.07	12.72				
8	13.54	13.41	13.97	15.04				
9	13.79	13.8	13.49	14.5				
10	11.25	13.73	13.25	14.08				
11	14.44	12.56	12.5	14.8				
12	13.83	12.32	15.01	14.56				
13	9.96	14.03	13.66	14.98				
14	12.57	12.85	13.7	14.54				
15	14.18	14.41	12.85	14.43				
16		15.54						
17		12.51						
18		13.8						
19								
20								

APENDICE V. En esta sección (Tabla 12) se presentan los datos utilizados para la realización del análisis estadístico. Es importante destacar que se utilizaron los valores de número de supervivientes y el promedio de la longitud en cada recipiente de cada lote experimental. Además se debe mencionar que los datos de supervivencia se transformaron a datos de arcoseno de la raíz del valor (es decir se obtuvo el arcoseno de la raíz de por ejemplo 19 organismos eclosionados) y los datos de longitud promedio de cada recipiente se transformaron a datos de log.

Tabla 12. Datos utilizados para la realización del análisis estadístico.

tratamientos	concentración	SUPERVIVENCIA	LONGITUD		tratamientos	concentración	SUPERVIVENCIA	LONGITUD
control	0.1	1.57079633	1.16463535		nitrito	0.1	1.57079633	1.15535122
control	0.1	1.24904577	1.18502247		nitrito	0.1	1.57079633	1.13714831
control	0.1	1.17309691	1.16688265		nitrito	0.1	1.57079633	1.17958051
control	0.1	1.24904577	1.16301221		nitrito	0.1	0.93774449	1.16772621
control	0.2	1.24904577	1.15281475		nitrito	0.2	0.88607712	1.11702258
control	0.2	0.93774449	1.14702953		nitrito	0.2	0.83548187	1.10881094
control	0.2	1.17309691	1.14614628		nitrito	0.2	0.93774449	1.1051432
control	0.2	1.10714872	1.13317951		nitrito	0.2	0.88607712	1.10568046
control	0.25	1.17309691	1.09793068		nitrito	0.25	0.39769942	1.12308905
control	0.25	1.04719755	1.13462329		nitrito	0.25	0.32175055	1.12287092
control	0.25	1.10714872	1.06081584		nitrito	0.25	0.52359878	1.11951982
control	0.25	0.99115659	1.11629932		nitrito	0.25	0.39769942	1.13054818
control	0.3	1.10714872	1.12763114		nitrito	0.3	0.78539816	1.03622954
control	0.3	0.73531445	1.11252615		nitrito	0.3	0.78539816	1.05453645
control	0.3	1.57079633	1.09797033		nitrito	0.3	0.6847192	1.05427782
control	0.3	1.10714872	1.09374991		nitrito	0.3	0.63305184	1.06392281
control	0.35	1.24904577	1.12723082		nitrito	0.35	0.57963974	1.07237246
control	0.35	1.34528292	1.11615315		nitrito	0.35	0.63305184	1.04537887
control	0.35	1.10714872	1.11985362		nitrito	0.35	0.52359878	1.0677402
control	0.35	1.34528292	1.09935346		nitrito	0.35	0.46364761	1.06809305
control	0.5	1.17309691	1.1521084		nitrito	0.5	0.63305184	1.06956239
control	0.5	0.93774449	1.15859443		nitrito	0.5	0.22551341	1.01535976
control	0.5	1.10714872	1.15777776		nitrito	0.5	0	0
control	0.5	1.04719755	1.16605496		nitrito	0.5	0.32175055	1.03941412

Continuación de la tabla 12. Datos utilizados para la realización del análisis estadístico.

tratamientos	concentración	SUPERVIVENCIA	LONGITUD		tratamientos	concentración	SUPERVIVENCIA	LONGITUD
control	0.1	1.57079633	1.16463535		nitrito	0.1	1.57079633	1.15535122
control	0.1	1.24904577	1.18502247		nitrito	0.1	1.57079633	1.13714831
control	0.1	1.17309691	1.16688265		nitrito	0.1	1.57079633	1.17958051
control	0.1	1.24904577	1.16301221		nitrito	0.1	0.93774449	1.16772621
control	0.2	1.24904577	1.15281475		nitrito	0.2	0.88607712	1.11702258
control	0.2	0.93774449	1.14702953		nitrito	0.2	0.83548187	1.10881094
control	0.2	1.17309691	1.14614628		nitrito	0.2	0.93774449	1.1051432
control	0.2	1.10714872	1.13317951		nitrito	0.2	0.88607712	1.10568046
control	0.25	1.17309691	1.09793068		nitrito	0.25	0.39769942	1.12308905
control	0.25	1.04719755	1.13462329		nitrito	0.25	0.32175055	1.12287092
control	0.25	1.10714872	1.06081584		nitrito	0.25	0.52359878	1.11951982
control	0.25	0.99115659	1.11629932		nitrito	0.25	0.39769942	1.13054818
control	0.3	1.10714872	1.12763114		nitrito	0.3	0.78539816	1.03622954
control	0.3	0.73531445	1.11252615		nitrito	0.3	0.78539816	1.05453645
control	0.3	1.57079633	1.09797033		nitrito	0.3	0.6847192	1.05427782
control	0.3	1.10714872	1.09374991		nitrito	0.3	0.63305184	1.06392281
control	0.35	1.24904577	1.12723082		nitrito	0.35	0.57963974	1.07237246
control	0.35	1.34528292	1.11615315		nitrito	0.35	0.63305184	1.04537887
control	0.35	1.10714872	1.11985362		nitrito	0.35	0.52359878	1.0677402
control	0.35	1.34528292	1.09935346		nitrito	0.35	0.46364761	1.06809305
control	0.5	1.17309691	1.1521084		nitrito	0.5	0.63305184	1.06956239
control	0.5	0.93774449	1.15859443		nitrito	0.5	0.22551341	1.01535976
control	0.5	1.10714872	1.15777776		nitrito	0.5	0	0
control	0.5	1.04719755	1.16605496		nitrito	0.5	0.32175055	1.03941412

Continuación de la tabla 12. Datos utilizados para la realización del análisis estadístico.

tratamientos	concentración	SUPERVIVENCIA	LONGITUD		tratamientos	concentración	SUPERVIVENCIA	LONGITUD
control	0.1	1.57079633	1.16463535		nitrito	0.1	1.57079633	1.15535122
control	0.1	1.24904577	1.18502247		nitrito	0.1	1.57079633	1.13714831
control	0.1	1.17309691	1.16688265		nitrito	0.1	1.57079633	1.17958051
control	0.1	1.24904577	1.16301221		nitrito	0.1	0.93774449	1.16772621
control	0.2	1.24904577	1.15281475		nitrito	0.2	0.88607712	1.11702258
control	0.2	0.93774449	1.14702953		nitrito	0.2	0.83548187	1.10881094
control	0.2	1.17309691	1.14614628		nitrito	0.2	0.93774449	1.1051432
control	0.2	1.10714872	1.13317951		nitrito	0.2	0.88607712	1.10568046
control	0.25	1.17309691	1.09793068		nitrito	0.25	0.39769942	1.12308905
control	0.25	1.04719755	1.13462329		nitrito	0.25	0.32175055	1.12287092
control	0.25	1.10714872	1.06081584		nitrito	0.25	0.52359878	1.11951982
control	0.25	0.99115659	1.11629932		nitrito	0.25	0.39769942	1.13054818
control	0.3	1.10714872	1.12763114		nitrito	0.3	0.78539816	1.03622954
control	0.3	0.73531445	1.11252615		nitrito	0.3	0.78539816	1.05453645
control	0.3	1.57079633	1.09797033		nitrito	0.3	0.6847192	1.05427782
control	0.3	1.10714872	1.09374991		nitrito	0.3	0.63305184	1.06392281
control	0.35	1.24904577	1.12723082		nitrito	0.35	0.57963974	1.07237246
control	0.35	1.34528292	1.11615315		nitrito	0.35	0.63305184	1.04537887
control	0.35	1.10714872	1.11985362		nitrito	0.35	0.52359878	1.0677402
control	0.35	1.34528292	1.09935346		nitrito	0.35	0.46364761	1.06809305
control	0.5	1.17309691	1.1521084		nitrito	0.5	0.63305184	1.06956239
control	0.5	0.93774449	1.15859443		nitrito	0.5	0.22551341	1.01535976
control	0.5	1.10714872	1.15777776		nitrito	0.5	0	0
control	0.5	1.04719755	1.16605496		nitrito	0.5	0.32175055	1.03941412

Continuación de la tabla 12. Datos utilizados para la realización del análisis estadístico.

tratamientos	concentración	SUPERVIVENCIA	LONGITUD		tratamientos	concentración	SUPERVIVENCIA	LONGITUD
amonio	0.1	1.10714872	1.14408749		nitrato	0.1	0.73531445	1.14162394
amonio	0.1	1.34528292	1.14164777		nitrato	0.1	1.10714872	1.159492
amonio	0.1	1.57079633	1.13060713		nitrato	0.1	1.04719755	1.11836649
amonio	0.1	0.93774449	1.08794515		nitrato	0.1	1.10714872	1.14017402
amonio	0.2	0.6847192	1.11201817		nitrato	0.3	0.73531445	1.12490254
amonio	0.2	0	0		nitrato	0.3	0.88607712	1.11240948
amonio	0.2	0.73531445	1.1059263		nitrato	0.3	0.99115659	1.11391949
amonio	0.2	0.46364761	1.09272064		nitrato	0.3	1.04719755	1.10378092
amonio	0.25	0.46364761	1.02263454		nitrato	0.5	1.57079633	1.16454616
amonio	0.25	0.32175055	0.96378783		nitrato	0.5	1.57079633	1.18015456
amonio	0.25	0.46364761	1.10754913		nitrato	0.5	1.57079633	1.16836488
amonio	0.25	0.52359878	1.09565744		nitrato	0.5	0.57963974	1.17060393
amonio	0.3	0.46364761	1.0548045		nitrato	2	1.10714872	1.11913212
amonio	0.3	0.32175055	1.07518185		nitrato	2	0.99115659	1.09229446
amonio	0.3	0.39769942	1.0705304		nitrato	2	0.57963974	1.07742847
amonio	0.3	0.46364761	2.4510761		nitrato	2	0.73531445	1.10079161
amonio	0.35	0.22551341	1.10105935		nitrato	4	0	0
amonio	0.35	0.39769942	1.07151381		nitrato	4	0	0
amonio	0.35	0.39769942	1.07003787		nitrato	4	0.39769942	1.11349769
amonio	0.35	0.22551341	1.04453976		nitrato	4	0.22551341	1.08421869
amonio	0.5	0	0		nitrato	5	0.22551341	1.00173371
amonio	0.5	0	0		nitrato	5	0	0
amonio	0.5	0	0		nitrato	5	0.32175055	1.09725731
amonio	0.5	0	0		nitrato	5	0	0