



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis toxicológico de la exposición de pez cebra
a agua colectada en el río Lerma, Gto. en la zona
posterior a vertederos industriales.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS DE LA TIERRA

P R E S E N T A:

BLANCA ESTELA SÁNCHEZ LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. MANUEL MIRANDA ANAYA

Querétaro, 2017





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 está 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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del Alumno

Sánchez
López
Blanca Estela
(442) 142 1138
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Ciencias de la Tierra
41308302-7

2. Datos del tutor

Dr.
Manuel
Miranda
Anaya

3. Sinodal 1

Dr.
Enrique Arturo
Cantoral
Uriza

4. Sinodal 2

Dra.
Miriam Guadalupe
Bojorge
García

5. Sinodal 3

M. en C.
Dalia Luz
De Ita
Pérez

6. Sinodal 4

M. en. C.
María Carolina
Muñoz Torres

7. Datos del trabajo escrito

Análisis toxicológico de la exposición de pez cebra a agua colectada en el río Lerma, Gto. en la zona posterior a vertederos industriales.

84 p
2017

CONTENIDO

	Página
Abreviaturas	7
Índice de Figuras	8
Índice de tablas	9
Resumen	10
I. Introducción	11
1.1 Contaminación del agua	11
1.2 Calidad de agua en México	12
1.3 Efectos de la contaminación en organismos acuáticos	14
1.3.1 Por metales pesados	15
1.3.2 Por fluoruro	15
1.3.3 Por cloruros	16
1.3.4 Por cianuros	16
1.3.5 Por nitrógeno inorgánico	16
1.3.6 Por contaminantes orgánicos	17
1.3.7 Por compuestos halogenados	17
1.3.8 Por grasas y aceites	18
1.3.9 Por jabones y detergentes	16
1.3.10 Por Plaguicidas	19
1.3.11 Por contaminación térmica	20
1.4 Efectos de la contaminación del agua en peces	20
1.5 El pez cebra (<i>Danio rerio</i> Hamilton-Buchanan) como modelo de estudio	21
1.6 Actividad de la Acetilcolinesterasa (AChE) y sus inhibidores	22
1.6.1 Efecto de los plaguicidas sobre la actividad de la AChE	23
1.6.2 Determinación de la actividad de la AChE	26
1.7 Estrés oxidativo	26
1.8 Lipoperoxidación	27
1.9 Ciclos diarios de actividad locomotriz	28
1.10 El río Lerma como caso de estudio	29
II. Pregunta de investigación	32
III. Hipótesis	32
IV. Objetivos	32
V. Materiales y métodos	33
5.1 Trabajo de campo	33
5.1.1 Toma de muestras para el bioensayo	33
5.1.2 Toma de muestras para análisis geoquímico (aniones y cationes)	34
5.1.3 Toma de muestra de organismos	34
5.2 Trabajo de laboratorio	34

5.2.1	Organismos de prueba	34
5.2.2	Sistema de registro.....	35
5.2.3	Organismos control y aplicación de la prueba de toxicidad con agua del río Lerma	36
5.2.4	Preparación de las muestras para pruebas bioquímicas	36
5.2.5	Prueba de Peroxidación lipídica por la técnica de Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS en inglés) y evaluación de la actividad de la AChE.....	36
5.3	Análisis químico (aniones y cationes) de las muestras de agua tomadas en campo y las muestras tomadas al principio y al final de la prueba de toxicidad con el agua del río Lerma.....	37
5.3.1	Preparación de las muestras de agua	37
5.4	Obtención y análisis de tejidos del pez colectado	38
5.4.1	Preparación de las muestras	38
5.5	. Expresión de resultados	39
VI.	Resultados.....	40
6.1	Prueba TBARS.....	40
6.2	Evaluación de la actividad de la AChE	42
6.3	Movimiento de organismos.....	44
6.4	Resultados de los análisis de tejidos.....	47
6.5	Resultados de los análisis de agua	47
6.5.1	Parámetros fisicoquímicos medidos en campo	47
6.5.2	Caracterización química de las muestras de agua: Aniones y Cationes	49
VII.	Discusión	51
VIII.	Conclusiones	62
IX.	Perspectivas	62
X.	Bibliografía.....	63
XI.	Anexos.....	75
	Anexo I. Álbum fotográfico.....	75
	Anexo II. Determinación de proteínas por el método de Bradford	79
	Anexo III. Determinación de la Peroxidación lipídica por la técnica de TBARS.....	81
	Anexo IV. Evaluación de la actividad enzimática de la AChE.....	83

DEDICATORIA

A mi familia, ustedes que siempre han estado conmigo, me han apoyado en todo momento y me han enseñado tanto.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la UNAM por abrirme sus puertas y acogerme con la mejor educación universitaria que pude haber recibido y por haberme permitido formar parte de la familia UNAM.

A mis padres: Agustín y Estela, que me impulsaron a cada momento, cada uno a su propia manera. En especial a ti mamá, gracias por apoyarme y creer en mí siempre, por acompañarme y ayudarme a ser mejor. Todo lo bueno que hay en mí te lo debo a ti, no tengo como agradecerte todo lo que has hecho por mí.

A mis profesores, por su apoyo y enorme paciencia para conmigo.

A quienes fueron mis tutores: Dra. Amanda, Dr. Carlos Mendoza, Dr. Gilberto, Dr. Manuel, con quienes compartí, en su momento, cada etapa como estudiante en Ciencias de la Tierra, gracias por sus consejos y apoyo.

A la gran familia UMDI, y a mis terrólogos favoritos:

- Sara, amiga y compañera de carrera, gracias por todos tus consejos, tu apoyo, por compartir las horas de risa y las de preocupación. Te quiero y te admiro.
- A mis compañeros de generación y a mis amigos de carrera: Carlos, Aura, Lulú Elí, Beto, David, Dany, Xou y en general a todos los que no menciono porque la familia UMDI es grande, en fin, ustedes saben que son los mejores. Gracias por acompañarme en “la tan temida Tesis” y en “las horas de desestrés”.

A mis compañeros del laboratorio de biogeorritmos: Moy por todos tus consejos y apoyo técnico, Hugo, Magda, Andy, Irma y Cinthia, por hacer las horas de trabajo y no trabajo más amenas.

Al equipo administrativo y apoyo técnico de la UMDI: Cony, Berta, Magnolia, Pilar, Mayra. Muchas gracias por su apoyo en los trámites, por las charlas y por toda su paciencia. Ustedes son uno de los principales engranes de la UMDI, gracias.

ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
C.E.E	Comunidad Económica Europea
ChAT	Acetil-colina-transferasa
cm	centímetro
CoA	coenzima A
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua
COM's	Carbamatados
BSA	Albúmina de suero bovino
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DDT	dicloro difenil tricloroetano
DQO	Demanda química de oxígeno
g	Gramos
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia, siglas en inglés
INECC	Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado por inducción
kg	kilogramo
L	litro
MDA	malondialdehído
mg	miligramos
ml	mililitro
nm	nanómetros
nmoles	nanomoles
OD	Oxígeno disuelto
OP's	insecticidas organofosforados
PCBs	bifenilos policlorados
PST	proteínas solubles totales
PUFA	Ácidos grasos polinsaturados
rpm	revoluciones por minuto
SST	Sólidos solubles totales
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, siglas en inglés
µL	microlitros
UNESCO	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
US. EPA	Agencia de protección Ambiental de los Estados Unidos

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Difusión de la ACh a través del espacio sináptico	23
Figura 2. Estructura general de los insecticidas organofosforados y carbamatados	24
Figura 3. Punto de muestreo. Río Lerma en el tramo que atraviesa la ciudad de Salamanca, Gto	33
Figura 4. Contenido de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los peces	41
Figura 5. Actividad de la actividad de la AChE en % de nmoles por minuto por mg de proteína medida de organismos en pool, del primer muestreo de agua.....	42
Figura 6. Actividad de la actividad de la AChE en % de nmoles por minuto por mg de proteína medida de organismos, del primer muestreo de agua	43
Figura 7. Actividad de la actividad de la AChE en % de nmoles por minuto por mg de proteína medida de organismos, del segundo muestreo de agua.....	44
Figura 8. Promedio de movimiento de los grupos de organismos monitoreados durante 72 horas	45
Figura 9. Perfiles de movimiento de los peces bajo registro de acuerdo a la detección del sensor durante las 24 horas en los tres días de la prueba.....	46

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Normas oficiales Mexicanas en cuestión de calidad de agua	13
Tabla 2. Composición del agua semidura reconstituida utilizada como medio de mantenimiento.....	35
Tabla 3. Concentraciones (mg/kg) de los tejidos extraídos del pez colectado comparados con la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-027-SSA1-1993 y con los límites reportados por la FAO (1983)	48
Tabla 4. Parámetros medidos en campo durante el primer y segundo muestreo	48
Tabla 5. Composición catiónica de las muestras de agua colectadas en el cauce del río Lerma	50
Tabla 6. Curva estándar de BSA	79
Tabla 7. Resumen del procedimiento de evaluación de AChE	83

RESUMEN

El río Lerma está considerando como uno de los ríos más contaminados de México, cruza los complejos industriales del Estado de México y Salamanca en Guanajuato. En la ciudad de Salamanca, se encuentran dos grandes industrias: La refinería Ing. Antonio M. Amor y la termoeléctrica de la Comisión Federal de Electricidad, mismas que representan fuentes importantes de descargas al río. Debido a lo anterior, se han detectado altas concentraciones de hidrocarburos, bifenilos policlorados y metales pesados como el cadmio (Cd), cobre (Cu) y plomo (Pb) en sedimentos del río a su paso por esta ciudad. El deterioro de la calidad de agua ha causado efectos adversos sobre la biota acuática y la salud humana. Un parámetro de daño es el estrés oxidativo, que ha sido usado como un bio marcador de daño oxidativo en organismos acuáticos expuestos a condiciones ambientales contaminadas, mientras que la inhibición de la actividad de la enzima Acetil colinesterasa (AChE) es considerado un indicador sensible en organismos expuestos a plaguicidas.

En este trabajo se evaluaron los efectos en la actividad enzimática de la AChE, el comportamiento locomotor diario y la peroxidación lipídica en tejidos de peces cebrá (*Danio rerio*) expuestos durante 72 horas a agua colectada en el río Lerma, en la ciudad de Salamanca Gto., se utilizó agua reconstituida para el grupo control. Además, se determinó la presencia de contaminantes en el agua del punto en el río donde se realizaron los muestreos. Al final de las pruebas de exposición, se determinó la actividad enzimática de la AChE, así como, las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) para ambos grupos y se obtuvieron los perfiles de movimiento de los peces durante las 72 horas de prueba. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los peces expuestos al agua del río Lerma están bajo mayor estrés y se mueven menos que los organismos control, la actividad de la AChE fue opuesta en ambos bioensayos. En las muestras de agua, las concentraciones de oxígeno disuelto (OD), así como las de F^- , Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Al , Ca y P se encuentran fuera de los límites permisibles en México y en una norma internacional, lo que podría estar influyendo en los resultados de actividad enzimática, estrés y movimiento medido en los organismos expuestos.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación del agua

El agua es esencial para la vida, es por ello que el desarrollo de grandes civilizaciones ha estado ligado al agua como recurso. En los últimos años se ha visto cada vez más claro que el mundo se enfrenta a una crisis de disponibilidad de agua dulce, que amenaza la seguridad, estabilidad y equilibrio medioambiental de las naciones, especialmente de las que se encuentran en proceso de desarrollo. Millones de seres humanos mueren cada año a causa de enfermedades relacionadas con la escasez de agua potable, mientras que al mismo tiempo aumentan, la contaminación de los recursos hídricos y la destrucción de los ecosistemas (UNESCO, 2003).

De acuerdo a la Carta del Agua, establecida por el consejo de Europa en 1968, la contaminación del agua consiste en una modificación, generalmente, provocada por el hombre, que la hace impropia o peligrosa para el consumo humano, la industria, la agricultura, la pesca y las actividades recreativas, así como para los animales domésticos y la vida natural (Carta del agua, Consejo de Europa, 1968, citado por Nieves *et al*, 2004).

El agua está contaminada cuando se ve alterada su composición química o estado físico, directa o indirectamente, como consecuencia de la actividad humana, de tal modo que queda menos apta para uno o todos los usos a los que está destinada, y para los que sería apta en su calidad natural (C.E.E. de las Naciones Unidas, 1961; citado por Nieves *et al*, 2004).

De acuerdo a Nieves *et al*. (2004), los parámetros generales indicadores de contaminación o calidad de aguas se clasifican según la naturaleza de la propiedad o especie que se determina, por lo que se pueden dividir en:

- Parámetros de carácter físico: características organolépticas, turbidez y materias en suspensión, temperatura y conductividad.
- Parámetros de carácter químico: salinidad y dureza, pH (acidez y alcalinidad), oxígeno disuelto (OD), y medidores de materia orgánica (DBO

y DQO), medidores de materia inorgánica (cationes, aniones, metales, etcétera.).

- Parámetros de carácter radioactivo: radiación alfa y beta total, y elementos individuales.
- Parámetros de carácter microbiológico: bacterias, virus, hongos y algas.

Las fuentes de contaminación más frecuentes son los residuos humanos, residuos y productos químicos industriales, plaguicidas y abonos agrícolas (UNESCO, 2003). Las formas más importantes de contaminación son los hidrocarburos, pesticidas, metales pesados (As, Cu, Zn, Cd, Pb, etc.) que pueden estar presentes en descargas industriales, sustancias acidificantes de lavaderos mineros, efluentes de fábricas de pulpa de madera, plásticos, y aguas residuales orgánicas (incluyendo desechos fecales) que pueden contener grandes cantidades de bacterias, nitrógeno inorgánico (nitratos, nitritos y amonio), fosfatos derivados de actividades como la piscicultura y escurrimientos agrícolas, sedimentos de erosión provocados por el hombre en ríos, lagos y pantanos, y la salinización (Austin, 1998; UNESCO, 2003).

Muchos procesos industriales y de agricultura han contribuido a la contaminación de sistemas de agua dulce, causando efectos adversos en la biota acuática y la salud humana (Doherty, *et al.* 2010).

1.2 Calidad de agua en México

En México las aguas residuales se generan al día a una velocidad de 30 m³/s, es decir, 43,200 m³ aproximadamente. Alrededor del 19 % de éstas se vierte directamente en algún cuerpo de agua sin un tratamiento previo (Arteaga, 2010).

Las fuentes de contaminación del agua se pueden clasificar por el área que afectan en forma directa, esto es como fuentes puntuales y fuentes difusas o no puntuales. Las primeras pueden causar degradación a escala local, mientras que las segundas pueden afectar grandes áreas (Cotler *et al.*, 2006).

Existen varias Normas Oficiales Mexicanas (NOM) en materia de agua que establecen límites permisibles para la presencia de contaminantes en descargas

realizadas a los cuerpos de agua, de esta manera se regula la contaminación que proviene de todas las ramas industriales y del drenaje municipal y urbano (Tabla 1).

Tabla 1. Normas oficiales Mexicanas en calidad de agua.

Norma Oficial Mexicana	Descripción	Publicación
NOM-001-SEMARNAT-1996	Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.	6 de enero de 1997
NOM-002-SEMARNAT-1996	Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal	3 de junio de 1998.
NOM-003-SEMARNAT-1997	Establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público.	21 de septiembre de 1998

Fuente: Comisión Nacional del Agua, 2014.

Por otra parte, para el monitoreo de la calidad de agua, existe una Red Nacional de Monitoreo que en el año 2009 contaba con 1510 sitios distribuidos en todo el país. Para la determinación de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, se cuentan con 13 laboratorios que pertenecen a la Red Nacional de Laboratorios. A partir del 2005, en algunas regiones del país se han realizado monitoreos biológicos que permiten evaluar la calidad de agua, tales como el índice de diversidad de organismos bentónicos (CONAGUA, 2014). Los Indicadores usados para determinar la calidad de agua en cuerpos de agua son: la Demanda Bioquímica de Oxígeno a cinco días (DBO_5), la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y la cantidad de Sólidos Disueltos Totales (SST).

En México se utilizan: la DBO_5 , DQO y SST. Los dos primeros indican la cantidad de materia orgánica presente en los cuerpos de agua, provenientes principalmente de descargas de agua de origen municipal y no municipal (CONAGUA, 2014). La

DBO₅ indica la cantidad de materia orgánica biodegradable, mientras que la DQO indica la cantidad total de materia biodegradable. El aumento en estos parámetros afectará la concentración de oxígeno disuelto en dicho cuerpo de agua y por lo tanto en los ecosistemas acuáticos. Con el aumento de la DQO se puede notar la presencia de sustancias provenientes de descargas no municipales. Los SST provienen de las aguas residuales y la erosión del suelo. Al aumentar los SST, la capacidad de un cuerpo de agua para soportar la vida disminuye (CONAGUA, 2014).

De acuerdo a los indicadores anteriores, en 2013 se evaluó la calidad del agua de diferentes cuencas en toda la República Mexicana con fuerte influencia antropogénica y se obtuvo que 260 de un total de 1, 471 de ellas se encuentran fuertemente contaminadas en alguno o en todos estos indicadores. La cuenca del río Lerma es una de ellas (CONAGUA, 2014).

1.3 Efecto de la contaminación de agua en organismos acuáticos

La introducción de sustancias, como desechos industriales y escorrentías de campos agrícolas han convertido ríos, lagos y aguas costeras en depósitos de aguas residuales contenedoras, entre otros, de pesticidas, metales pesados e hidrocarburos, provocando la alteración del equilibrio y funcionamiento natural de estos ambientes (Förstner y Wittmann, 1979).

La contaminación reduce el número de especies debido a la eliminación de aquellas especies sensibles al contaminante, lo cual provoca que los organismos tolerantes se reproduzcan más rápidamente debido a la falta de competencia. Esta es una situación clave ya que debido a que los organismos tolerantes pueden ser encontrados en ambientes contaminados y ambientes no contaminados la combinación de los organismos tolerantes con la ausencia de aquellos organismos no tolerantes es un buen indicador de contaminación (Cairns y Dickson, 1971). Así mismo, la alteración morfológica, fisiológica, conductual o sexual de algunos organismos pueden indicar contaminación e incluso de los posibles contaminantes.

1.3.1 Por metales pesados

Los metales pesados como el cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), selenio (Se) y zinc (Zn), son elementos que tienen un peso atómico y densidad cinco veces mayor a la del agua (Singh *et al.*, 2011), se encuentran naturalmente en el ambiente como parte de minerales y rocas. Su mal manejo y aplicaciones industriales, domésticas, médicas y en la agricultura han conducido a su amplia distribución en el ambiente. Es sabido que algunos de estos elementos son requeridos para varias funciones bioquímicas y fisiológicas, pero también es sabido que en una cantidad inadecuada pueden resultar tóxicos y afectar la integridad de los organismos que han estado expuestos a ellos causándoles enfermedades y en el peor de los casos provocando su muerte (Tchounwou, 2012). La toxicidad de estos metales depende de distintos factores incluyendo la dosis, la ruta de exposición, especies químicas, así como la edad, el género y el estado nutricional de los individuos expuestos.

Existen distintas fuentes de metales pesados: geogénicos, industriales, agrícolas, farmacéuticos, efluentes domésticos y fuentes atmosféricas (Tchounwou, 2012). Las descargas de contaminantes pueden conducir a su acumulación de en organismos acuáticos (Austin, 1998). En este sentido las algas y moluscos son comúnmente usados como indicadores de metales traza en cuerpos de agua (Rainbow, 1995). Se ha encontrado que las microalgas son capaces de acumular metales traza alcanzando concentraciones cientos de veces mayores a las concentraciones correspondientes en el agua de mar (Conti y Cecchetti, 2003).

1.3.2 Por fluoruro

El fluoruro es tóxico para las algas, plantas acuáticas, invertebrados y peces de los sistemas dulceacuícolas y marinos. La contaminación por fluoruro puede darse de forma natural (presente en minerales) o derivada de la acción del hombre (procesamiento de aluminio, acero, manufactura de acero, semiconductores y procesos de electro platinado). Su toxicidad radica en que principalmente los iones fluoruro actúan como venenos enzimáticos, inhibiendo la actividad enzimática,

interfiriendo en procesos metabólicos tales como glicolisis y síntesis de proteínas (Camargo, 2003).

1.3.3 Por cloruros

La preocupación con el cloro (Cl^-) no es por el ion, si no por los compuestos que se forman cuando los cloruros son introducidos al agua en descargas industriales por medio de anti incrustantes en sistemas de refrigeración industrial o para la desinfección de aguas residuales. El cloro como gas libre no existe en el agua, pues tiende a formar rápidamente ácido hipocloroso (HOCl^-) o hipocloritos (OCl^-) los cuales son llamados “cloros libres”. En presencia de amonio, los cloros libres forman monocloramina (NH_2Cl), conocida como cloro combinado. Los cloros libres son más tóxicos que los combinados, pero estos últimos tienden a ser más estables y persistir por más tiempo (Heath, 1995).

1.3.4 Por cianuros

El radical cianuro ocurre con mayor frecuencia en desechos industriales, particularmente de aquellos relacionados con la industria manufacturera de plásticos y procesamiento de metales. Los “cianuros libres” ocurren principalmente como ácido cianhídrico (a menos que el pH esté por encima de 9) e inhiben a la enzima citocromo oxidasa en las mitocondrias celulares, lo cual suprime la respiración aerobia. Los peces son los organismos más susceptibles a los cianuros ya que la exposición a estos reduce su capacidad reproductiva, les provoca nado errático y alteraciones en el movimiento (Eisler, 1991).

1.3.5 Por nitrógeno inorgánico

La contaminación con nitrógeno inorgánico puede incrementar la concentración de iones hidrógeno en ecosistemas de agua dulce que no cuenten con una buena capacidad ácido neutralizante, resultando en la acidificación de esos sistemas ecológicos. Por otro lado, también puede estimular el desarrollo, mantenimiento y la proliferación de productores primarios y con esto, provocar la eutrofización de agua dulce, estuarina y ecosistemas marinos costeros. En algunos casos también puede inducir la aparición de algunas toxinas. El efecto del nitrógeno inorgánico

sobre la fauna consiste en perjudicar su capacidad para sobrevivir, crecer y reproducirse. La contaminación de aguas subterráneas y superficiales con nitrógeno inorgánico puede provocar efectos adversos sobre la salud humana y la economía (Camargo y Alonso, 2006).

1.3.6 Por contaminantes orgánicos

Los contaminantes orgánicos son compuestos que contienen enlaces carbono-carbono en su estructura química, provienen principalmente de desechos domésticos, agrícolas e industriales. Se descomponen fácilmente debido a procesos físicos, químicos y biológicos, pero otros, aquellos provenientes de sustancias sintetizadas con fines comerciales (solventes, lubricantes, derivados de petróleo, etcétera) no pueden ser degradados naturalmente. Los microorganismos que actúan sobre los contaminantes orgánicos consumen el oxígeno disuelto del agua y en el proceso producen dióxido de carbono, agua e iones inorgánicos no degradables. La capacidad de remoción está ligada a la cantidad de oxígeno disuelto en el cuerpo de agua. Cada vez que se vierten desechos biodegradables a un cuerpo de agua, la cantidad de oxígeno disuelto disminuye debido a la actividad bacteriana, pudiendo alcanzar condiciones anaerobias (Avelar-González *et al.*, 2008).

1.3.7 Por compuestos halogenados

- Los bifenilos policlorados (PCB's)

Los PCBs son un grupo de compuestos organoclorados de fórmula general $C_{12}H_{10-x}Cl_x$. Son químicamente inertes y difíciles de quemar, insolubles en agua, pero solubles en ácidos grasos. Se utilizaron como fluidos de refrigeración en transformadores eléctricos y condensadores, plastificantes. Estos compuestos organoclorados, al igual que las dioxinas policloradas (PCDD) y dibenzofuranos policlorados (PCDF), afectan el sistema inmunológico de los mamíferos y son teratógenos, mutagénicos y carcinógenos. Debido a su naturaleza relativamente volátil y a su estabilidad, los PCBs han recorrido grandes distancias y por lo tanto pueden encontrarse en regiones polares como en el fondo de los mares (Avelar-González *et al.*, 2008).

1.3.8 Por grasas y aceites

Este grupo está conformado, principalmente, por mezclas orgánicas complejas de lípidos de origen vegetal y animal, además de una gran diversidad de hidrocarburos de peso molecular alto (queroseno, lubricantes minerales, asfaltos y otros derivados del petróleo) las cuales son liposolubles. Los lípidos constituyen el principal componente de los residuos de comida, por lo que son los contaminantes primordiales de las aguas residuales domésticas, aunque también constituyen desechos de industrias. Las grasas y aceites tienden a formar monocapas en la superficie de los cuerpos de agua, lo cual interfiere con el intercambio de gases entre la atmósfera y la superficie del cuerpo de agua, lo que puede provocar condiciones anóxicas o anaeróbicas en el ecosistema acuático. Además, en altas concentraciones, la adhesión de las grasas y aceites al cuerpo y branquias de los organismos acuáticos, interfiere con la respiración (Avelar-González *et al.*, 2008).

1.3.9 Por jabones y detergentes

También conocidos como surfactantes o sustancias tensoactivas ya que reducen la tensión superficial del agua. Son altamente usados a nivel doméstico e industrial en muchas actividades de limpieza, razón por la que constituyen un contaminante importante en las aguas residuales y de muchos cuerpos de agua. Tiene una toxicidad moderada para las formas de vida acuáticas, además de ser (en su mayoría) biodegradables. La formación de espuma y la interferencia en el intercambio de oxígeno constituyen los principales problemas de estos compuestos. Debido a que los fosfatos son un componente activo de los detergentes y que difícilmente pueden ser separados de las aguas residuales, son descargados a los cuerpos de agua. Ya que los fosfatos son un nutriente importante en el crecimiento de organismos primarios en los cuerpos de agua, su incremento puede conllevar al crecimiento de algas y plantas acuáticas que pueden conducir a la eutrofización (Avelar-González *et al.*, 2008).

1.3.10 Por plaguicidas

Los plaguicidas se pueden clasificar por su naturaleza química, 1) en inorgánicos como los arsenicales y los cloratos, en 2) orgánicos (botánicos y microbianos) como las piretrinas y *Bacillus thuringiensis*, respectivamente, y 3) sintéticos que incluyen a los plaguicidas organoclorados (dicloro difenil tricloroetano (DDT), aldrín, dieldrín, lindano y clordano), los organofosforados (malatión, paratión y diclorvos), los carbamatos (aldicarb, carbarilo, carbofurano y metiocarb), herbicidas fenoxiácidos y sus derivados (2, 4- D y 2, 4, 5-T); los fungicidas (captan, zineb, thiram). Los plaguicidas llegan a los cuerpos de agua por aplicación directa, por drenajes agrícolas o por precipitación. La toxicidad de estos compuestos está dada por el tipo de plaguicida y destacan por el tiempo de exposición a ellos. La exposición aguda (menor tiempo de exposición a dosis más altas) normalmente provoca la muerte de peces o de aves por la ingestión de insectos de áreas donde estos plaguicidas han sido usados, mientras que la exposición crónica (menor concentración del plaguicida por un tiempo más prolongado) generalmente no produce efectos letales, pero si provoca daños a diversas funciones biológicas. Entre los efectos subletales producidos por los plaguicidas en aves, se encuentran los que afectan principalmente la reproducción. Por ejemplo, los DDE (diclorodifenildicloroetileno) provocan el adelgazamiento del cascarón de los huevos en varias especies de aves como el halcón y el águila, así como disminución en la tasa reproductiva. En los organismos acuáticos, los efectos son muy variados ya que alteran la tasa de reproducción y crecimiento, así mismo perturban los procesos de osmoregulación y consumo de oxígeno. Adicionalmente, en mamíferos marinos como las ballenas, los delfines y las focas, cuya masa corporal presenta una gran proporción de grasa, la acumulación de los plaguicidas organoclorados se ve facilitada (Avelar-González *et al.*, 2008).

1.3.11 Por contaminación térmica

El gran volumen de agua utilizada por la industria, principalmente para enfriamiento y producción de energía eléctrica, produce grandes cantidades de agua caliente, que se vierte a los desagües y que posteriormente llega a los cuerpos de agua. Lo anterior representa un problema en lugares cerca de las latitudes, donde la temperatura del agua varía unos cuantos grados como las tropicales y subtropicales, ya que el agua caliente puede causar la migración y la desaparición de varias especies. Por el contrario, en lugares con climas templados o fríos, el agua caliente no es un problema ya que al calentar el agua fría se extiende el periodo de actividad biológica de los animales acuáticos, lo cual puede ser utilizado para la acuicultura (Avelar-González *et al.*, 2008).

1.4 Efecto de la contaminación del agua en peces

Cuando los contaminantes entran a los ambientes acuáticos y pueden ser encontrados en los tejidos de vertebrados acuáticos y de los animales invertebrados (Austin, 1998). Por lo que, en general, la contaminación del agua, afecta a la población de peces (Peña, 2001).

Algunas de las sustancias contaminantes inducen hipoxia, ya sea por la reducción de la concentración del oxígeno disuelto en el agua, o por la modificación de las branquias de los peces, lo que disminuye la velocidad de transferencia del oxígeno, o afecta el metabolismo aerobio. Los tóxicos antes mencionados, pueden causar efectos adversos en el metabolismo de los organismos acuáticos en distintas formas: pueden afectar la integridad celular, la eficiencia energética de la célula o la velocidad de excreción de un metabolito, entre otras. (Peña, 2001).

Lo anterior indica que hay una buena correlación entre un ambiente acuático contaminado y la mortalidad de sus peces. Las enfermedades animales que han sido reportadas en peces y asociadas a un ambiente contaminado incluyen papiloma epidérmico, pudrición de la cola y aletas, hiperplasia en las branquias, ulceración en la piel y enfermedades virales, entre otras. El desencadenamiento

de estas enfermedades sido relacionado a dietas contaminadas con metales pesados, hidrocarburos, compuestos nitrogenados (por ejemplo, amonio), nitritos, pesticidas, aguas residuales, y a otros contaminantes no específicos. Mientras que la pudrición de la cola y las aletas, ulceración e hiperplasia podrían estar asociados a implicaciones bacterianas (Austin, 1998).

Las aguas eutrofizadas con residuos fecales y altos niveles de materia orgánica han sido asociadas a muertes por bacterias entéricas como *Citrobacter freundii* y *Edwardsiella tarda*, por ejemplo (Austin, 1998).

En cuanto a biomarcadores, la peroxidación lipídica ha sido usada como indicador de daño oxidativo en los organismos acuáticos expuestos a condiciones ambientales contaminadas (Valavanidis, 2010). Por otro lado, la inhibición de actividad enzimática de la Acetil colinesterasa (AChE) se considera el biomarcador más sensible para confirmar la exposición a plaguicidas organofosforados (Cardona Mena, 2008).

1.5 Pez cebra (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) como modelo de estudio

Debido a lo complicado que resulta realizar pruebas *in situ* con peces de vida silvestre y con el fin de establecer modelos de prueba que reflejen ciertas situaciones, es necesario desarrollar ensayos simples y a corto plazo basados en el uso de especies modelo como el pez cebrá (*Danio rerio*) (Andersen *et al.* 2010).

El pez cebrá, una especie originaria de la India, ha sido utilizado como modelo en biología experimental y genética molecular para evaluar efectos tóxicos de una sustancia (o un grupo de ellas). Debido al conocimiento que se tiene sobre sus características morfológicas y bioquímicas en sus etapas tempranas de desarrollo y en los adultos de ambos sexos, su uso de pez cebrá resulta ideal en investigaciones toxicológicas donde el objetivo es identificar los efectos adversos de la exposición química (Hill *et al.* 2005).

Comparando el pez cebrá con otros peces, su tamaño (pequeño) de 3 a 4 cm reduce el espacio y los costos de crianza, por lo que actualmente hay una gran cantidad de acuarios capaces de criar cientos de estos peces. Su uso, representa

una disminución de costos en cuanto a la cantidad de reactivos utilizados en la preparación de soluciones tanto para el tratamiento y mantenimiento de los peces vivos, así como para realización de varios ensayos y evaluaciones histológicas (Hill *et al.*, 2002). Además de las ventajas antes citadas cabe mencionar que el tamaño pequeño de los huevos y embriones permite la operación de las pruebas de detección de alto rendimiento, generando así una base de datos de muchas muestras repetidas para la evaluación estadística y la validación de los resultados (Álvarez, 2011).

1.6 Actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) y sus inhibidores

La Acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima del grupo de las hidrolasas y una de las más importantes para los organismos vivos, principalmente para los vertebrados, incluyendo a los humanos. La AChE se encuentra en el sistema nervioso y en los músculos, se encarga de regular la cantidad de Acetilcolina (ACh) (neurotransmisor específico en la sinapsis colinérgica del sistema nervioso) presente durante la señal de transmisión nerviosa (Wiesner, 2007). Algunos compuestos como los pesticidas carbamatos, organofosforados y organoclorados (Podolska y Napierska, 2006), metales pesados (Zinkl *et al.* 1991), hidrocarburos y detergentes (Payne *et al.* 1996) pueden afectar la actividad de la AChE.

Funcionamiento de la AChE

La acetilcolina (ACh), es un neurotransmisor de invertebrados producido en los axones terminales de la neurona mediante la utilización de dos sustancias precursoras: el acetato y la colina. Su síntesis exige la incorporación del acetato a la colina, por lo que es necesaria la intervención del sistema enzimático acetilcolina-transferasa (ChAT) y de la coenzima A (CoA) para transferir el acetato. Una vez producida la ACh, la despolarización neuronal, propicia su secreción al espacio sináptico. Ahí se activarán los receptores (colinérgicos) que permitirán la unión de la ACh con la acetilcolinesterasa (AChE) (**Figura 1**). Durante este proceso los canales iónicos (Na^+/K^+) se abrirán, la AChE inactivará a la ACh separándola en acetato y colina. Esta será recapturada por la proteína

transportadora de colina y será reciclada para volver a producir ACh, provocando el cierre del canal. El potencial eléctrico producido se propagará por toda la superficie del músculo, promoviendo la liberación intracelular de iones de calcio (Ca^{2+}) que posteriormente se unirán a la troponina, provocando así la contracción muscular.

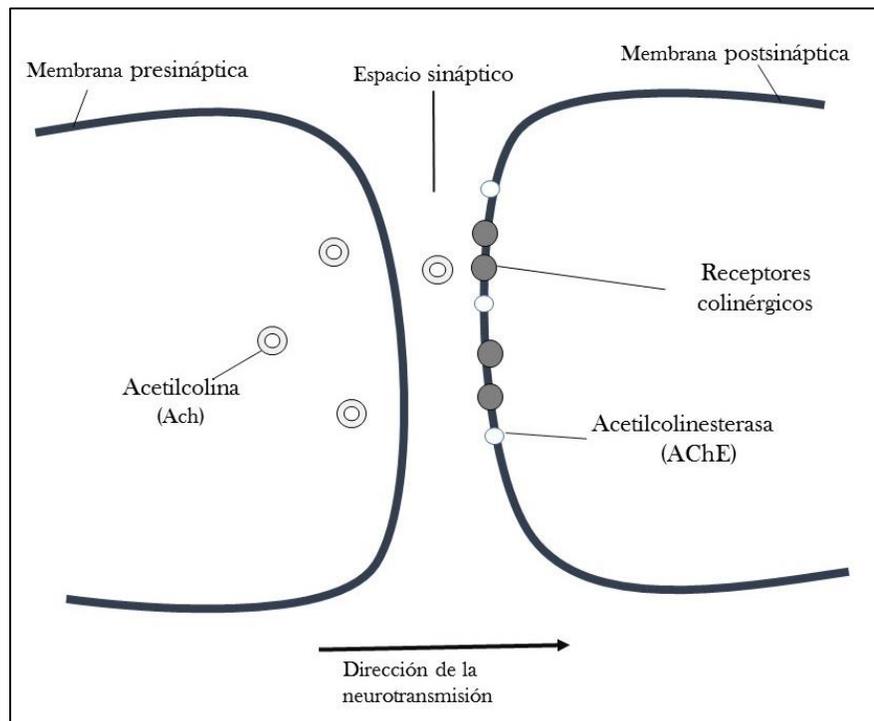


Figura 1. Difusión de la ACh a través del espacio sináptico para unirse con su receptor y realizar la transmisión del impulso nervioso/sinapsis colinérgica (Walker, 2008).

1.6.1 Efecto de los plaguicidas sobre la actividad de la AChE

Los organofosforados y carbamatos constituyen una amplia cantidad de compuestos sintéticos que son utilizados en la fabricación de insecticidas. Aunque también han sido usados como armas químicas, y agentes terapéuticos en medicina humana y veterinaria (Gupta *et al.* 2011).

Los compuestos organofosforados son ésteres derivados de los ácidos fosfórico, fosfónico, fosforotioico o fosfonotioico, con grupos amino o tiol presentes en algunos casos en sus moléculas. En su mayoría, estos compuestos son solubles en el agua y son poco volátiles (a excepción de los diclorvos). Su principal forma de degradación es mediante la hidrólisis (Jaramillo, 2008).

Los compuestos carbamatos incluyen en su mayor parte derivados del ácido N-metil- carbámico. Son moderadamente solubles en solventes orgánicos como el benceno y el tolueno, y un poco más solubles en etanol y acetona. Por el contrario su solubilidad en agua es baja (Jaramillo, 2008). En el ambiente, su degradación se realiza por hidrólisis y oxidación dependiendo del grupo microbiano (Rozo y Caredenal, 2013).

Actualmente los insecticidas organofosforados (OP's), como el malatión o el paratión, y los carbamatados (COM's), como el aldicarb y el bendiocarb, (**Figura 2**), son los pesticidas más ampliamente usados en agricultura y silvicultura en el mundo, desde la prohibición del uso de los insecticidas organoclorados (Gupta *et al.* 2011).

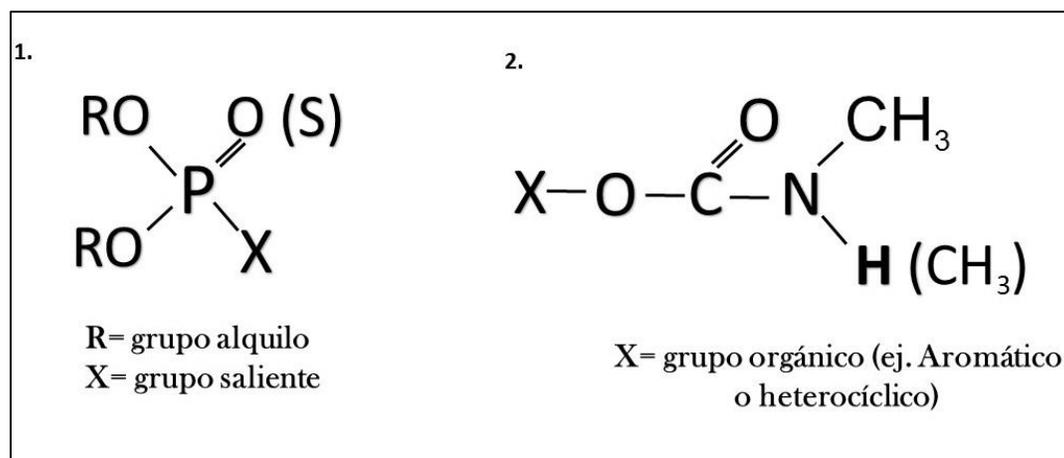


Figura 2. Estructura general de los insecticidas organofosforados (1) y carbamatados (2).

El mecanismo de toxicidad más aceptado de los plaguicidas anteriores, implica la inhibición de la AChE (Camean, 1995). Su mecanismo molecular de acción radica en la fosforilación o carbamilación del residuo de serina²⁰³ y la formación de un

intermediario organofosforado o carbamil al unirse a la AChE. Esta enzima fosforilada o carbamilada es más estable y tiene una tasa de hidrólisis y regeneración más baja que la enzima activa. Además, algunas de esas enzimas fosforiladas pueden perder un grupo alquilo durante las siguientes 24-48 horas, antes de que la enzima activa pueda ser regenerada. A este proceso se le conoce como “envejecimiento” donde una enzima “envejecida” es permanentemente fosforilada y no puede regenerarse por medio de hidrólisis (Kwong, 2002).

La inhibición de la AChE resultará en la acumulación de ACh, lo cual tendrá efectos en los receptores muscarínicos (salivación, dolor de estómago, vómito, entre otros) y nicotínicos (debilidad, fasciculación muscular, hipertensión, taquicardia) y del sistema nervioso muscular, provocando la interrupción normal de los impulsos nerviosos y la contracción muscular (Kwong, 2002). En el caso de los insectos y los pájaros, la toxicidad selectiva de algunos insecticidas organofosforados, se debe a que estos animales poseen niveles bajos de esterasas de tipo A (aquellas que hidrolizan ésteres con grupos arílicos y que pueden utilizar los organofosforados como sustratos) (Camean, 1995) y esto los hace más susceptibles a ellos.

Además de los insecticidas anti-colinesterasa, otros tipos de contaminantes ambientales como los pesticidas y los metales pesados tienen el potencial de afectar (inhibir) la actividad de la AChE en organismos expuestos a ellos. En organismos vertebrados acuáticos hay una diversidad considerable en las propiedades bioquímicas y la distribución de la AChE, así como su sensibilidad a los agentes anticolinesterasa. Sin embargo, varios estudios han utilizado la inhibición de la actividad de AChE como una herramienta para diagnosticar la exposición de peces a pesticidas organofosforados o carbamatados (Lionetto *et al.* 2003).

1.6.2 Determinación de la actividad de la AChE

De los distintos métodos utilizados para medir la actividad de las colinesterasas destacan los métodos espectrofotométricos. De ellos, el método que más se utiliza es el descrito por Ellman (1961). En este, se emplea como sustrato la ACh, y se produce un mercaptano, tras la hidrólisis enzimática, el cual reacciona con el ácido 5,5' ditiobis-nitrobenzoico, desdoblándolo en dos productos, uno de los cuales, el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, producto de color amarillo que absorbe a 412 nm. La actividad de la AChE, susceptible de la evaluación colorimétrica, es expresada como actividad específica/mg de proteína soluble total (nmoles/min/mg PST) (Vanegas-Pérez *et al.* 2015).

1.7 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se produce cuando hay un desbalance entre las defensas antioxidantes y las especies reactivas de oxígeno (EROS), como el oxígeno atómico (O), el ozono (O₃), el oxígeno singulete (¹O₂), y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂); situación que conlleva al daño oxidativo a macromoléculas estructurales o funcionales (Catala, 2012; Fassiano, 2012), como la membrana celular.

La lipoperoxidación es considerada como uno de los mecanismos principales involucrados en el daño oxidativo a las estructuras celulares y en procesos de toxicidad que conducen a la muerte celular (Repetto *et al.* 2012). Se caracteriza por incrementar los niveles de productos oxidativos de las moléculas, tales como las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y carbonilos proteicos.

1.7.1 Lipoperoxidación

La lipoperoxidación es una reacción en cadena iniciada por la abstracción de un hidrógeno o la adición de radical oxígeno, resultando en el daño oxidativo de los ácidos grasos polinsaturados (PUFAS, por sus siglas en inglés), debido a que estos son más débiles que los ácidos grasos saturados. El puente de metileno activado (RH) representa un sitio blanco. La iniciación, como es conocida esta

parte del proceso, es usualmente llevada a cabo por un radical con suficiente reactividad (O , 1O_2 , H_2O_2) (**reacción 1**):



El oxígeno molecular rápidamente se adhiere al radical centrado en carbono formado en este proceso, cediendo el radical lipidoperoxil (ROO) (**reacción 2**):



La formación de radicales lipidoperoxil conduce a la producción de hidroperóxidos orgánicos, mismos que, pueden sustraer un hidrógeno de otro PUFA, análogos a la reacción 1 (**reacción 3**):

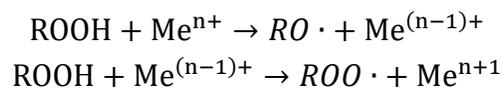


A esta reacción se le conoce como propagación e implica que la acción inicial resulte en la conversión de varios PUFA a lipidohidroperóxidos. En este punto, y siguiendo este orden, también se generan radicales alquilo, peroxilos y alcoxilos en la reacción en cadena de los radicales libres. El radical alquilo es estabilizado por un reacomodamiento a un dieno conjugado que es, relativamente, un producto estable.

El lípido hidroperóxido es el primer producto estable de la reacción de lipoperoxidación. Bajo condiciones donde la lipoperoxidación es continuamente iniciada, la terminación se lleva a cabo con la destrucción de dos radicales a la vez:



En la presencia de metales de transición, ROOH da lugar a la generación de radicales capaces de reiniciar la lipoperoxidación por el ciclo redox de los iones metálicos (Repetto *et al.*, 2010a; Repetto & Boveris, 2012):



Los complejos de hierro oxidado y reducido (Fe^{2-} y Fe^{3+}) pueden participar en la propagación de la reacción en cadena, la cual continúa hasta que dos radicales se conjugan uno al otro o por la acción de un antioxidante que lo detiene tal como la vitamina E (α -tocopherol) (Halliwell y Gutteridge, 1984).

Muchos de los productos de la lipoperoxidación pueden ser encontrados en fluidos biológicos, así como en derivados adicionales de los productos reactivos finales. Como resultado de la lipoperoxidación una gran variedad de aldehídos puede ser producidos, incluyendo hexanal, malondialdehído (MDA) y 4 hidroxilnonenal (Repetto *et al.* 2012).

Dado que la lipoperoxidación se considera un mecanismo de toxicidad importante, ha permitido su uso como herramienta de diagnóstico, con capacidad predictiva de evidenciar el impacto de los contaminantes sobre los organismos (Ochoa y González, 2008).

De los distintos métodos utilizados para determinar estrés oxidativo, uno de los índices más frecuentemente utilizados para estimar el daño oxidativo a los lípidos es la técnica de TBARS. Donde el malondialdehído (MDA) es el principal sustrato de esta reacción. El MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) en un medio ácido caliente para dar un complejo color rojo, cuyo máximo de absorción es a 532nm (Fassiano, 2012). Debido a su alta sensibilidad, este método ha sido adoptado para medir la lipoperoxidación en tejidos animales (Okhawa *et al.* 1979).

1.8 Ciclos diarios de actividad locomotriz

Como parte de la evolución y en un entorno cíclico gobernado por la rotación de la tierra, un mecanismo oscilador interno ha aparecido en la mayoría de los organismos vivos (Sánchez-Vázquez *et al.* 1996). Los ritmos circadianos corresponden a un tipo de reloj endógeno que controla los patrones de comportamiento diario en la mayoría de los organismos y que se sincroniza con los ciclos externos del día-noche (Aschoff, 1984; Luna *et al.*, 2000).

Los ritmos biológicos forman parte del proceso de adaptación al ambiente. De éstos depende el ajuste de los procesos internos con los cambios periódicos

externos, de esta manera se prepara al organismo para situaciones predecibles y repetitivas. Estos ritmos son genéticos y característicos de cada especie animal, aunque puede haber variaciones de un individuo a otro (Scaglione *et al.*, 2014).

Los peces muestran comportamientos asociados a ritmos circadianos. Por lo tanto, el inicio de la actividad a menudo anticipa la transición de la luz a oscuridad o viceversa (Eriksson y Veen, 1980).

Se sabe que la actividad locomotriz de los peces se sincroniza con el patrón luz-oscuridad. En condiciones constantes de laboratorio (luz-oscuridad, temperatura y humedad), los ritmos biológicos continúan expresándose por días, meses e incluso años, dependiendo de la especie y de las condiciones experimentales, es entonces cuando se denominan ritmos en libre curso (Scaglione *et al.* 2014). Las oscilaciones en el patrón locomotor tienen un correlato endógeno, y se encuentran sincronizadas con las variaciones de las condiciones ambientales (*zeitgeber*), a las cuales el organismo está expuesto (Luna *et al.* 2000). Aún en condiciones de ritmos en curso libre, los peces cuentan con un sistema circadiano flexible, es decir, pueden presentar una dualidad de fase (dualidad nocturno/diurno) e inestabilidad del periodo endógeno (Scaglione *et al.* 2014). Estos rasgos son de gran interés para el análisis de efectos subletales de contaminantes, pues son integrados de manera muy fina en el sistema nervioso y a nivel molecular del reloj circadiano.

1.9 El río Lerma como caso de estudio

El río Lerma se origina en los manantiales de Almoloya del Río, en el estado de México, atraviesa hacia el noroeste del Valle de Toluca, formando parte del sistema Lerma Chapala-Santiago (río Lerma, lago de Chapala y río Santiago). Con el nombre del río Lerma cruza los estados de México, Michoacán, Querétaro y Guanajuato; luego se dispersa en el Lago de Chapala y renace fortalecido con el nombre del río Santiago, así cruza los estados de Jalisco y Nayarit, para desembocar finalmente en el Golfo de San Blas, Nayarit (Lomelí-Meza, 2009; citado por De la Cruz Barrón, 2012), en el océano Pacífico.

El río Lerma cubre 700 km siendo el principal cauce de la Cuenca Lerma-Chapala, desde Toluca a Guadalajara. A lo largo de su recorrido recibe varios afluentes de los que destacan: Río la Gavia, Río Jaltepec, Río Laja, Río Silao (Guanajuato), Río turbio, Río Angulo, Río Duero y Río Zula. Cruza los complejos industriales del Estado de México y Salamanca (Arteaga, 2010). En décadas recientes, el crecimiento demográfico, el aumento de la actividad industrial y la apertura de tierras a labores agrícolas y pecuarias en la cuenca del Lerma han demandado un mayor consumo y contaminación del agua de la región (Escobar, 2006).

Tenía un caudal inicial de 10 m³/s, de agua limpia, para el 2002 conducía un caudal de 1.2 m³/s. de aguas negras, por lo que su influencia en la recarga de agua subterránea ha disminuido considerablemente (Atlas Urbano Cuenca Lerma, 2002; pp.23).

A lo largo del cauce del río, desde el estado de México, hay aportes de materia orgánica vía aguas residuales y municipales, así como escurrimientos de rellenos sanitarios y fertilizantes (Arteaga-Gómez., 2010).

Una gran parte de los ríos –el río Verdiguél en el municipio de Toluca, por ejemplo- y arroyos tributarios del río Lerma son empleados como como vertederos de aguas negras, ya sea de origen doméstico e industrial, e incluso de origen agrícola (herbicidas, pesticidas, entre otros); situación que genera el actual grado de contaminación que presenta el río. El tratamiento de aguas residuales y/o negras por parte de las plantas de tratamiento, como Toluca y RECICLAGUA, en estado de México, por ejemplo, resultan insuficientes, ya que no logran tratar el 100% los contaminantes de las aguas y tampoco captan las fuentes generadoras de aguas residuales (Atlas Urbano Cuenca Lerma, 2002; pp. 23, 90).

La ciudad de Salamanca, en el estado de Guanajuato, es una zona industrial muy importante para la región del bajío, debido a que dos grandes empresas se ubican ahí desde los años 50's: La refinería Ing. Antonio M. Amor (R.I.A.M.A), una de las más productivas del país (Sedeño-Díaz y López-López, 2007) y la termoeléctrica de la Comisión Federal de Electricidad, que además de traer consigo un desarrollo

industrial importante para la región también representan fuentes de descargas industriales al río Lerma (De la Cruz Barrón, 2012).

Brito *et al.* (2015) reporta, para los sedimentos del río Lerma en Salamanca, concentraciones altas de hidrocarburos (de 2935 a 28 430 μm^{-1} de hidrocarburos poliaromáticos totales, PAHs), metales como Cd, Cu y Pb de acuerdo a los límites permisibles establecidos por la EPA, y bifenilos policlorados (de 54 a 123 μm^{-1} de PCBs totales) en varios puntos del río localizados en su trayectoria a lo largo de la ciudad (desde su entrada, hasta su salida).

Lima y Mazar (2005) reportan que las condiciones bacteriológicas y fisicoquímicas del agua de la cuenca Lerma-Chapala sobrepasan los límites permisibles para la vida acuática, uso de suelo, y uso agrícola de acuerdo con la NOM-001-ECOL-1996 y con la Ley Federal de Derechos, disposiciones aplicables en materia de aguas federales (DOF, 2005), por lo cual no es recomendable su uso para fines agrícolas y recreativos que se desarrollan dentro de la cuenca y representa un riesgo para el consumo humano.

El efecto del deterioro de la Cuenca Lerma- Chapala sobre los peces se resume con la presencia de tan sólo 17 (43%) de sus 42 especies de acuerdo a la NOM-059-ECOL (Atlas de la cuenca Lerma-Chapala, 2002). El fuerte deterioro ambiental de la cuenca ha promovido el aumento de especies exóticas en la misma.

Estudios recientes en el río Laja, un tributario del Medio Lerma, muestran cambios negativos en su composición y en la estructura de sus comunidades de peces debido a la degradación ambiental. Así, las especies nativas, las bentónicas, las sensibles y las carnívoras declinan, mientras que las exóticas, tolerantes y omnívoras tienden a incrementarse (Mercado Silva *et al.* 2006).

II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efectos fisiológicos tendrá la exposición aguda a agua colectada del río Lerma (posterior a vertederos industriales en Salamanca, Guanajuato), en la actividad locomotriz, la lipoperoxidación y en la actividad de la AChE del pez cebra?

III. HIPÓTESIS

Los peces cebra expuestos al agua colectada en el río Lerma a su paso por la ciudad de Salamanca en Guanajuato presentarán una menor actividad enzimática de la Acetilcolinesterasa (AChE), mayor estrés oxidativo y cambios negativos en el patrón de movimiento en comparación con los peces no expuestos (controles).

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la toxicidad de la exposición aguda a agua colectada en el río Lerma a su paso por la ciudad de Guanajuato, sobre la fisiología y conducta motora en pez cebra (*Danio rerio*).

Objetivos particulares

- Determinar la presencia de peces y contaminantes (inorgánicos) del agua del punto de muestreo del río Lerma.
- Evaluar los efectos de la exposición durante 72 horas a agua colectada en el río Lerma en la ciudad de Salamanca Guanajuato, sobre el comportamiento locomotriz diario, en la inhibición de la actividad de la Acetilcolinesterasa (AChE) y en la peroxidación lipídica (TBARS) en tejidos de peces cebra en condiciones de laboratorio.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Trabajo de campo

5.1.1 Toma de muestras para bioensayo

Se colectaron 60L de agua del cauce del río Lerma, en el borde del río que se encuentra en la zona centro de la Ciudad de Salamanca (cerca de “los puentes gemelos”, en la zona centro) (**Figura 3**). El recipiente con el agua colectada se mantuvo en hielo y en condiciones de oscuridad (INECC-CCA, 2010) desde el punto de muestreo hasta el laboratorio en la UMDI-UNAM en Juriquilla, Qro., donde fue usada de inmediato para el bioensayo.

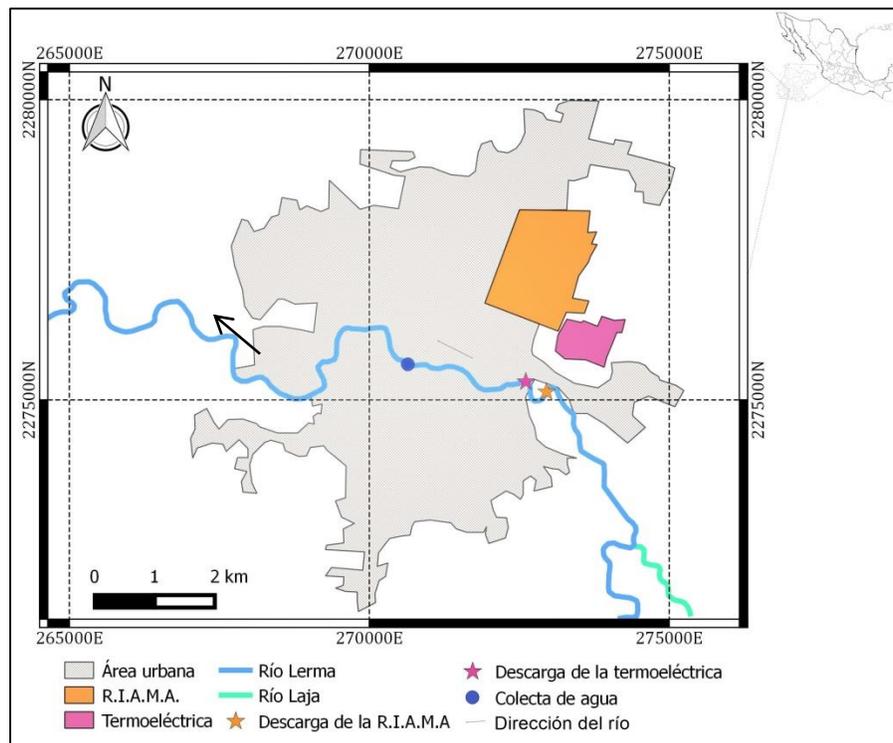


Figura 3. Punto de muestreo del agua del Río Lerma. Cauce del río Lerma en el tramo que atraviesa la ciudad de Salamanca, Guanajuato. Se muestra la ubicación de la refinería (R.I.A.M.A.) (anaranjado), la Termoeléctrica (rosa) y la dirección del río (→).

5.1.2 Toma de muestras para análisis geoquímico (aniones y cationes).

Fueron colectados en el mismo sitio y de acuerdo a las recomendaciones de INECC (2010), seis muestras simples, tres para análisis de aniones y tres de cationes, además de un blanco de campo utilizando frascos de polietileno de alta densidad de 120 mL.

Se midió en campo el pH (pH- metro HI 8424 HANNA), la temperatura del agua utilizando pH- metro HI 8424 HANNA, así como la cantidad de nitratos en el agua colectada, adaptado al método de la reducción de cadmio (EPA, 1993) utilizando un fotómetro multiparamétrico de banco (HI 83099, HANNA) al principio y al final de la prueba. Se determinó la cantidad de oxígeno disuelto del agua del río en el punto de muestreo y en el laboratorio, así como del agua reconstituida, para ello se ajustó el valor de corrección de la altitud especificada en el manual del equipo, se utilizó un oxímetro portátil resistente al agua con tubo galvánico HI 9147, HANNA^R. Todas las muestras se mantuvieron en hielo (-4°C) hasta su llegada al laboratorio donde fueron refrigeradas (-5°C) para su análisis (INECC-CCA, 2010).

5.1.3 Toma de muestra de organismos

Mediante pesca directa, se colectó un ejemplar de pez cíclido (aproximadamente 200 g) que fue encontrado muerto en el mismo punto dónde las muestras de agua fueron colectadas en el río Lerma. Se guardó en una bolsa de plástico sellable y se mantuvo en hielo desde el sitio de muestreo hasta su congelación en el laboratorio (-25°C). No se realizó identificación taxonómica del ejemplar colectado.

5.2 Trabajo de laboratorio

5.2.1 Organismos de prueba.

Los peces cebra (*Danio rerio*) se obtuvieron de un acuario comercial y se mantuvieron en aclimatación controlada durante un mes antes de su uso en el bioensayo. Se utilizó agua semidura reconstituida como medio de mantenimiento (Tabla 2) siguiendo las recomendaciones del INECC, 2008.

Tabla 2. Composición del agua semidura reconstituida utilizada como medio de mantenimiento (INECC, 2008).

Reactivos grado analítico (mg/L) en agua destilada o desionizada Características finales							
Tipo de agua semidura	NaHCO ₃	CaSO ₄ .2H ₂ O	MgSO ₄	KCl	pH ^a	Dureza ^b	Alcalinidad
	96	60	60	4	7.4-7.8	80-100	60-70

^a Valor de equilibrio después de 24 horas de aireación

^b Expresado como mg/L de CaCO₃.

Para la reconstitución del agua no se utilizó CaSO₄.2H₂O debido a que se alcanzó el pH deseado.

Durante el periodo de aclimatación, los peces cebra fueron alimentados diariamente con hojuelas Wardley^R que contienen principalmente harina de pescado, harina de trigo, harina de soya, concentrado de proteínas de pescado y harina de germen de trigo.

5.2.2 Sistema de registro de actividad locomotriz.

Los peces estuvieron expuestos a un ambiente estático que consistió en acuarios de vidrio (450 mL de capacidad c/u) donde fueron colocados individualmente. Cada acuario fue acondicionado con un sensor de luz infrarroja para monitorear simultáneamente el movimiento de los peces, tanto del grupo control como los peces expuestos al agua del río Lerma. La actividad se evaluó mediante el número de interrupciones al circuito infrarrojo durante cada 10 minutos durante las 72 horas de duración de la prueba, utilizando el programa ACTIBIO (diseñado por la Facultad de Psicología y la Facultad de Ciencias, UNAM) y los promedios fueron evaluados, a través del software ACTIVIEW (Minimmiter, Co. Inc., versión 1.2, 1998, USA), se analizaron los datos en Microsoft Excel 2010.

5.2.3 Organismos control y aplicación de la prueba de toxicidad con agua del río Lerma.

Para la prueba se tuvieron dos grupos de organismos: controles (n=5 y n=15, primer y segundo bioensayo, respectivamente) y experimentales (n=6 y n=15). Durante el bioensayo, los organismos control estuvieron expuestos a agua reconstituida. Los peces del grupo experimental estuvieron expuestos al agua que previamente colectamos en el río Lerma. Se realizó el registro de actividad de ambos grupos de peces durante 72 horas, una vez terminado el tiempo de registro, todo tejido fue procesado y se congeló a -80°C para su posterior análisis bioquímico (Summer *et al.* 2007) en un ultra congelador Froilabo, Big Memory^R.

El bioensayo se realizó dos veces: marzo del 2016, y enero del 2017 en el Laboratorio de Biogeorritmos en la UMDI-Facultad de Ciencias, UNAM, Campus Juriquilla, Qro.

5.2.4 Preparación de las muestras para pruebas bioquímicas

Utilizando los datos de los pesos de cada pez, se homogenizaron las muestras obtenidas con buffer de homogeneización en relación final 1:5 (1g de tejido en 4mL de buffer de homogeneización a 10,000 rpm/1min hasta romper completamente el tejido de los peces, el tubo se mantuvo en hielo durante todo el proceso. El homogenado de las muestras fue centrifugado durante 10 minutos a 10,000 rpm en una centrífuga Mikro 120, Hettich Instruments. En cada una de las muestras se separó el sobrenadante en tubos Eppendorf y fueron congelados a -80°C para su análisis posterior.

5.2.5 Prueba de Peroxidación lipídica por la técnica de Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS en inglés) y evaluación de la actividad de la AChE.

Se determinó la cantidad de proteínas solubles totales (PST) en las muestras de tejido colectadas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Se realizaron las mediciones de lipoperoxidación mediante la técnica de TBARS de acuerdo a Junqueira *et al.* (2004). Se evaluó la actividad de la AChE de acuerdo a Zúñiga *et al.* 2015.

5.3 Análisis químico (aniones y cationes) de las muestras de agua tomadas en campo y las muestras tomadas al principio y al final de la prueba de toxicidad con el agua del río Lerma

5.3.1 Preparación de las muestras de agua

Se filtraron 20 mL de las muestras de agua utilizando una membrana con diámetro de poro de 0.40- 0.45 μ . Se agregaron 0.3mL de HNO₃ al 20% (como preservador) a las muestras para análisis de cationes. Las muestras para análisis de aniones no fueron acidificadas.

Los análisis de cationes se hicieron por espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado por inducción (ICP-OES) (USDA, 2016), usando el Software Iteva 2.8.0.97, mediante el método QCS26 para metales pesados (200.7 EPA). Se utilizó un equipo Thermo iCAP 6500 Duo View. Las condiciones del plasma para el análisis fueron: RF (radiofrecuencia) 1150 W, flujo del gas auxiliar 0.5 L/min, flujo del gas de nebulización 0.6 L/min., flujo del gas refrigerante 10- 20 L/min. y tiempo deestabilización de 2 seg. La calibración del equipo se realizó utilizando siete estándares preparados a partir de estándares mono elementales de la marca Inorganic Ventures. Se obtuvieron dos curvas de calibración, para 4 y 24 elementos respectivamente, con un coeficiente de correlación de 0.999 para todos los elementos. Se incluyeron muestras de control de laboratorio para monitorear el correcto desempeño del equipo. Las muestras se analizaron con tres repeticiones.

El análisis de aniones se hizo por cromatografía de alta resolución (HPLC), utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Dionex ICS-2500 HPLC/IC con bomba de gradiente cuaternario, detector de conductividad, Uv-Vis, amperometría y voltimetría y una columna AS14 y supresor ASRM 4 MM, de acuerdo al método EPA 300, aplicable a aguas superficiales y aguas subterráneas.

Se utilizó como fase móvil una solución 8.0 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ para acarreo de la muestra a un flujo de 1 mL/min. con un volumen de inyección de 50 μL . Se realizó la calibración del equipo utilizando siete estándares de diferentes concentraciones Inorganic Ventures IF- FAS-1A y una muestra control de laboratorio (MCL) preparada a partir de un Seven Anion Standard de Dionex. El coeficiente de correlación de las curvas analíticas usadas fue de 0.999 y los porcentajes de recuperación mayores a 90%.

La preparación de las muestras para análisis se realizó en el Laboratorio de Geoquímica ambiental del centro de Geociencias, UNAM Juriquilla.

Los resultados fueron comparados con los Criterios Ecológicos de Calidad del Aguas CE-CCA 001/89 y con los límites establecidos por la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (US. EPA) para calidad de aguas.

5.4 Obtención y análisis de tejidos del pez colectado

5.4.1 Preparación de las muestras

En el laboratorio, se extrajeron los tejidos musculares del dorso lateral (FAO, 1983), branquias, hígado y riñones del ejemplar colectado utilizando una navaja limpia de acero inoxidable. Las muestras fueron guardadas en tubos Eppendorf de 1.6 ml.

Para su análisis, se pesaron por triplicado 0.3 g de cada una de las muestras de músculo, hígado y riñón. Sin embargo, debido a la pequeña cantidad de muestra de branquias solo fue posible obtener un duplicado.

Para hígado, riñones, y músculo, se contó con una muestra original, un duplicado y una muestra fortificada (a la que se le agrega una cantidad conocida de estándar) a la cual se le agregaron 0.125 mL de reactivo QCS26. Mientras que para las branquias sólo se contó con la muestra original y una fortificada. Las muestras fueron tratadas con HNO_3 al 78% grado instra JTBaker y digeridas en un microondas CEM MarxXpress con controlador de temperatura utilizando el método *Maiz* en una sola etapa, a una potencia máxima de 800W, en una rampa de 20

minutos hasta llegar a una temperatura de 190°C, manteniéndola durante 10 minutos (USDA, 2016).

Las muestras digeridas fueron filtradas utilizando un embudo de plástico y frascos de polietileno de alta densidad, se aforaron con agua desionizada a 30 mL. Posteriormente fueron analizadas por espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado por inducción (ICP-OES) (USDA, 2016), usando el Software Iteva 2.8.0.97, mediante el método QCS26 para metales pesados (200.1 EPA). Se utilizó un equipo Thermo iCAP 6500 Duo View.

Las concentraciones de metales fueron comparadas con la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-027-SSA1-1993 que establece los criterios para los tejidos de pez para consumo humano, y con la recopilación de los límites legales para sustancias peligrosas en pescado y productos pesqueros de la FAO (1983).

5.5 . Expresión de resultados

Se obtuvieron los promedios, desviación estándar y error estándar en Excel 2010 de los resultados obtenidos de las pruebas de TBARS, actividad de la AChE y perfil de movimiento. Se hizo una prueba de T-student para los promedios de movimiento de ambos grupos (Control y grupo expuesto al agua del río Lerma), así como Mann Whitney U Test para los resultados obtenidos en las pruebas de TBARS y actividad de la AChE utilizando el software Statistica™. Fue considerada significativa la diferencia estadística con una $p < 0.05$.

VI. RESULTADOS

6.1 Resultados prueba TBARS

Los niveles de lipoperoxidación fueron expresados como la relación porcentual de la concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en cada uno de los grupos de peces: controles y los expuestos al agua del río Lerma (grupo experimental), correspondientes al primer y segundo muestreo (**Figura 4**, grafica superior e inferior, respectivamente).

En los peces del primer muestreo, se observa que la concentración de TBARS de los peces expuestos al río Lerma aumenta un 51% con respecto al grupo control. En cuanto a la capacidad oxidante (serie Fe^{2+}), el grupo control presenta un porcentaje mayor (192.4%) que el grupo experimental (125.9%).

En los peces correspondientes al segundo muestreo los peces expuestos al agua del Lerma, muestran un aumento del 154% en la concentración de TBARS con respecto al grupo control. Respecto a la capacidad oxidante total (serie Fe^{2+}) del grupo control y el grupo experimental tuvieron resultados similares: un 382.6% y en un 382.7%, respectivamente. De acuerdo a la prueba Mann Whitney U Test ($p=4$) no se encontraron diferencias significativas en ambos muestreos (Figura 4).

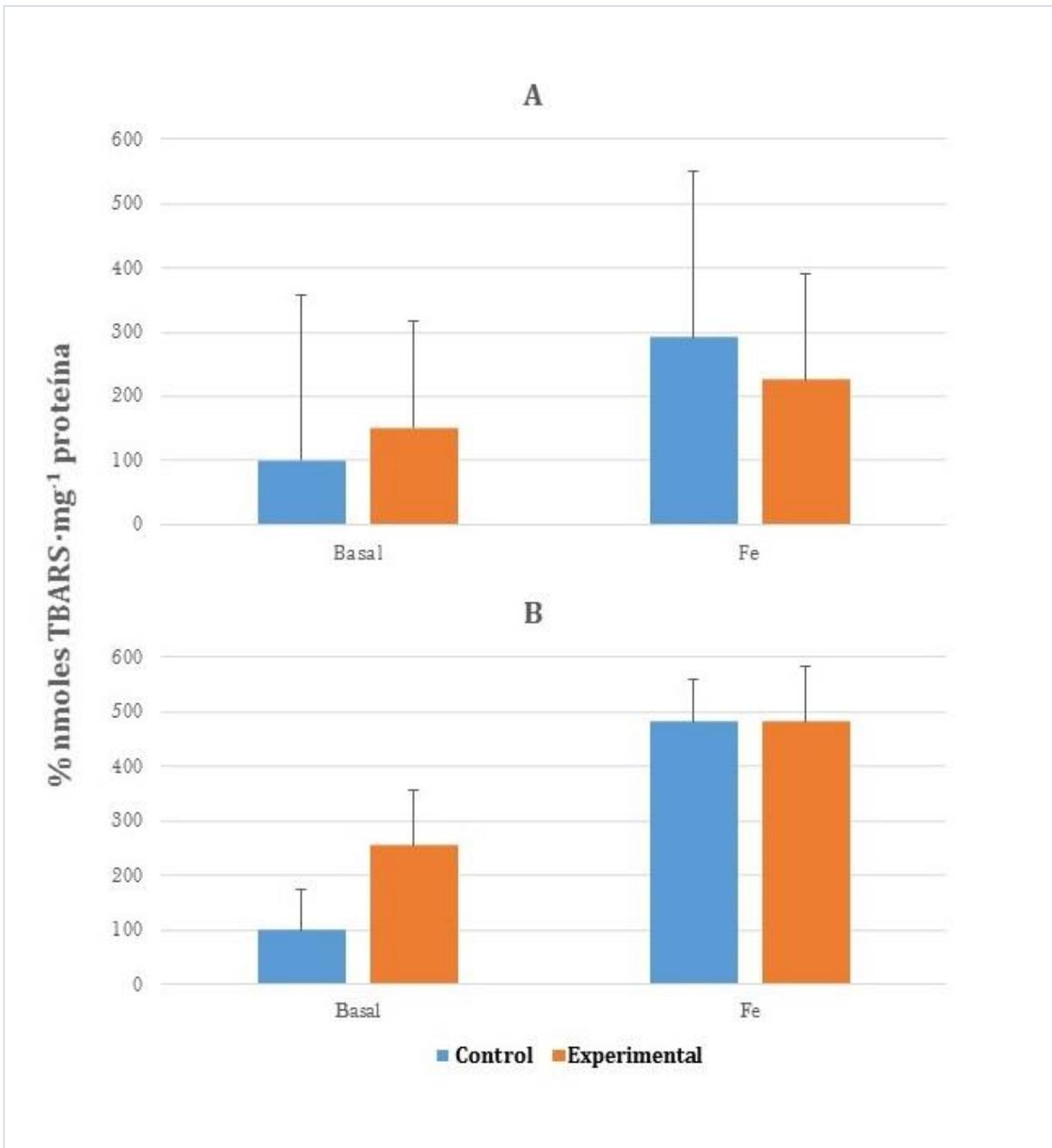


Figura 4. Contenido de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de los peces del primer (A) y segundo (B) muestreo. Controles en azul (n=5 y n=15 de A y B, respectivamente) y experimentales en naranja (n=6 y n=15 de A y B, respectivamente). Valores expresados en % nmol·mg⁻¹ de proteína. Las barras representan el error estándar.

6.2 Evaluación de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE)

En las determinaciones de la actividad de AChE en ambos grupos de peces (muestra en pool y de peces individuales) correspondientes al primer muestreo, se observa una disminución de actividad de esta enzima en los organismos expuestos al agua del río Lerma. En las muestras en pool (Figura 5) se observa un decremento en la actividad de la enzima de 96.58 % de los peces del grupo experimental con respecto al grupo control. Aunque el mismo comportamiento es observado en los resultados de la prueba realizada a los individuos por separado donde la actividad de la enzima correspondiente al grupo experimental disminuye en un 97.4% (Figura 6) no se encontraron diferencias significativas ($p= 0.86$).

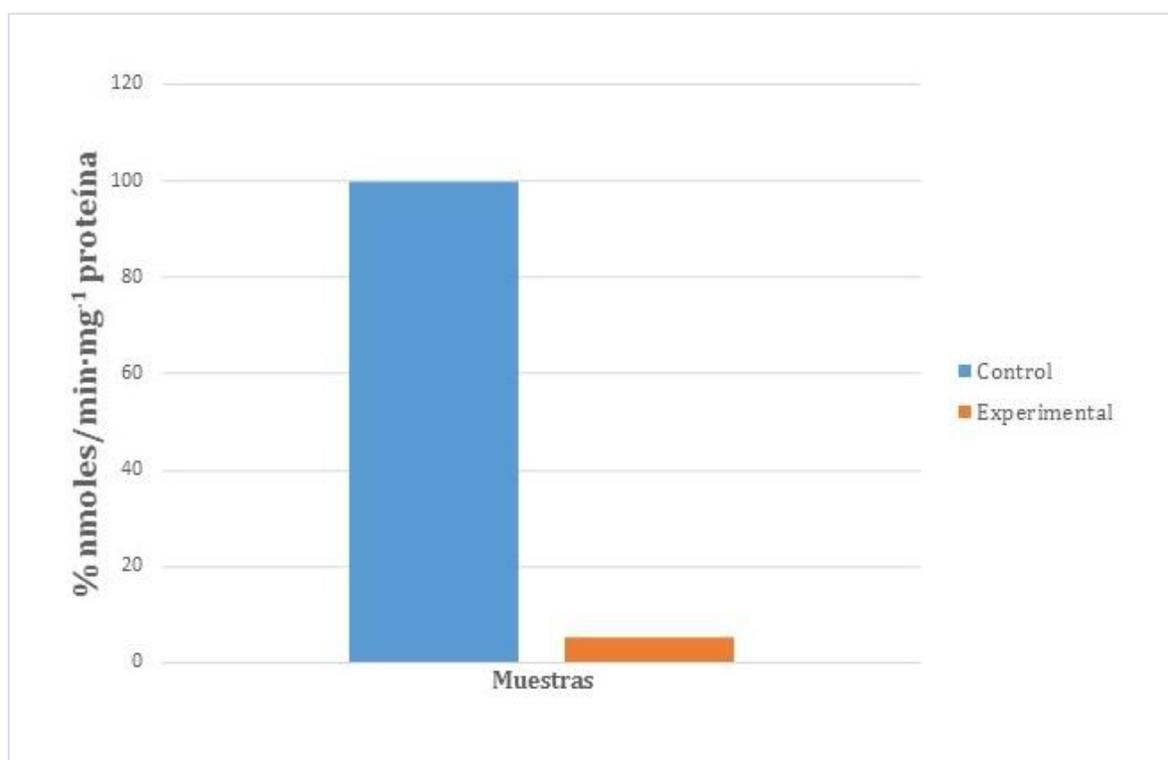


Figura 5. Actividad de la AChE en % de nmoles por minuto por mg de proteína medida de organismos en pool, del primer muestreo de agua.

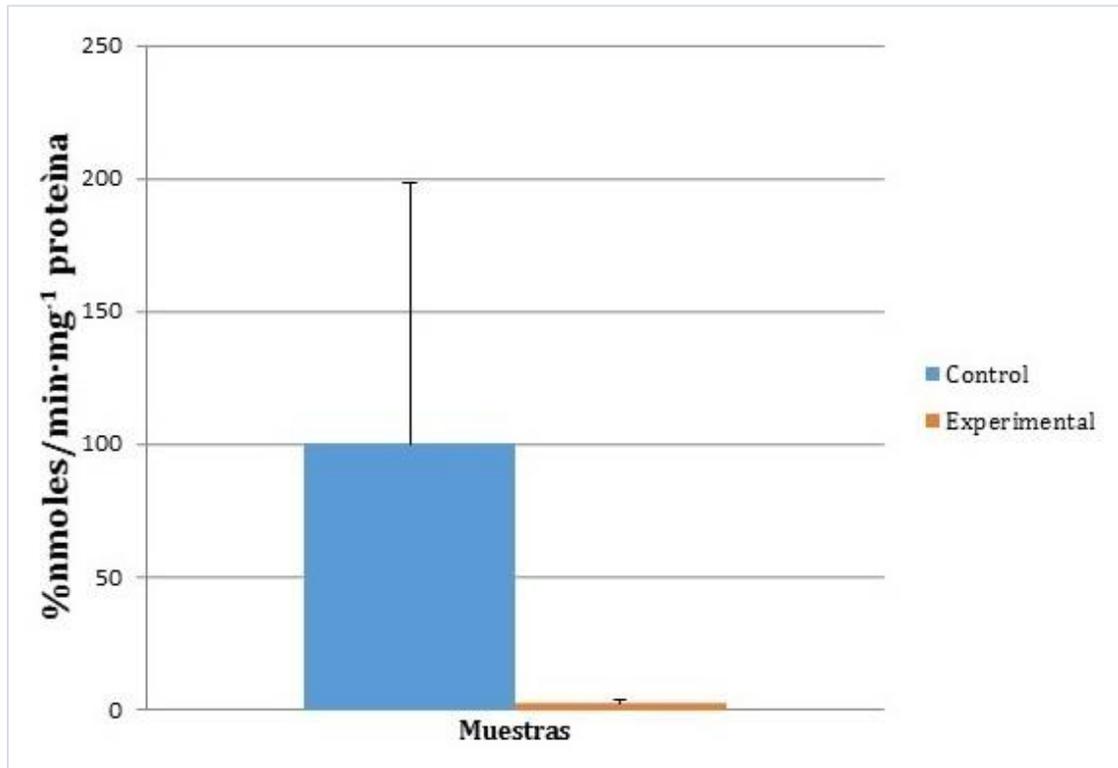


Figura 6. Actividad de la actividad de la AChE en % de nmoles por minuto por mg de proteína medida de organismos, del primer muestreo de agua. La barra vertical muestra el error estándar.

Los resultados de la prueba Mann Whitney U Test realizada a los peces expuestos al agua del río Lerma del segundo muestreo (grupo experimental) y los peces no expuestos al agua del río Lerma (grupo control) muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) en el comportamiento de la actividad de la AChE. La cual es menor en los organismos del grupo control con respecto a los organismos del grupo experimental (aumento de la actividad de un 40%) (Figura 7).

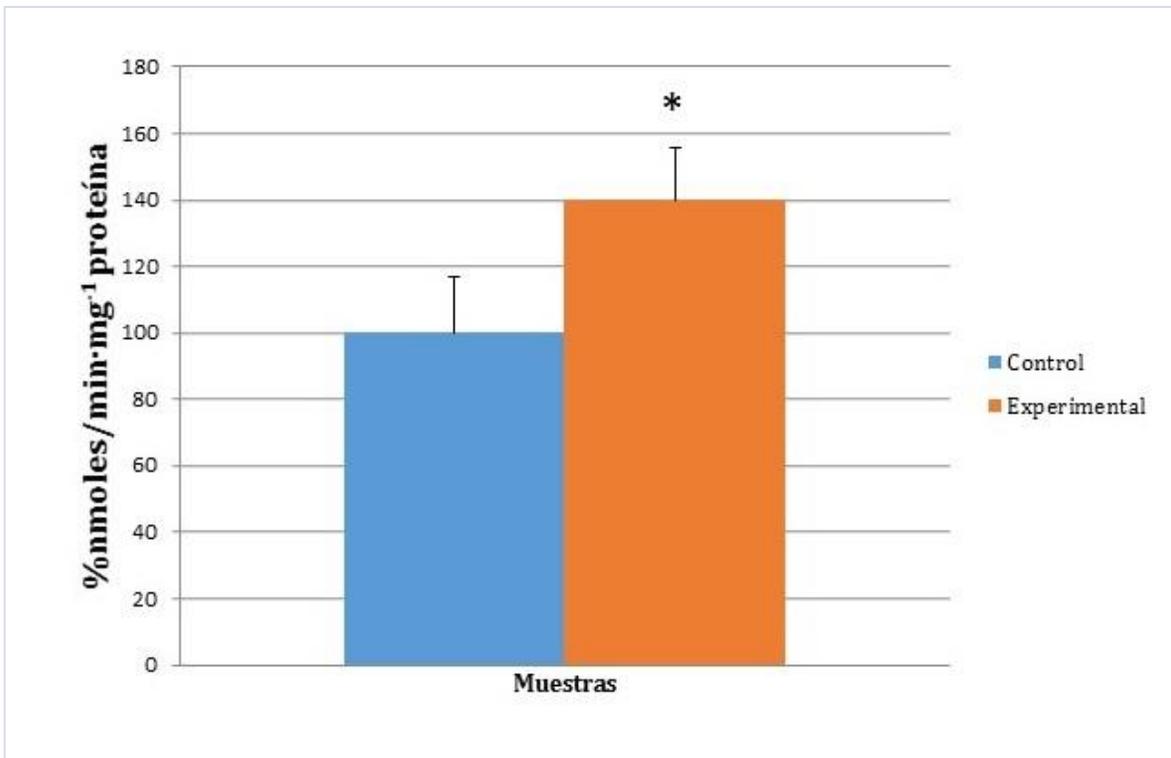


Figura 7. Actividad de la actividad de la AChE en % de nmoles por minuto por mg de proteína medida de organismos, del segundo muestreo de agua (control: n=15 y experimental: n= 15). La barra vertical muestra el error estándar y * representa diferencia significativa $p < 0.05$ (Mann Whitney U Test).

6.3 Movimiento de organismos.

De los promedios de movimiento obtenidos de todos los organismos monitoreados durante las 72 horas en ambas repeticiones de la prueba (los dos muestreos de agua) (Figura 8) se observa que los peces expuestos al agua del río Lerma (grupo experimental) se mueven significativamente menos ($p < 0.05$) que los correspondientes al grupo control. Este mismo comportamiento se observa en los perfiles de movimiento (Figura 9) donde hay mayor movimiento ($p < 0.05$) por parte de los organismos control con respecto los peces expuestos al agua del Lerma.

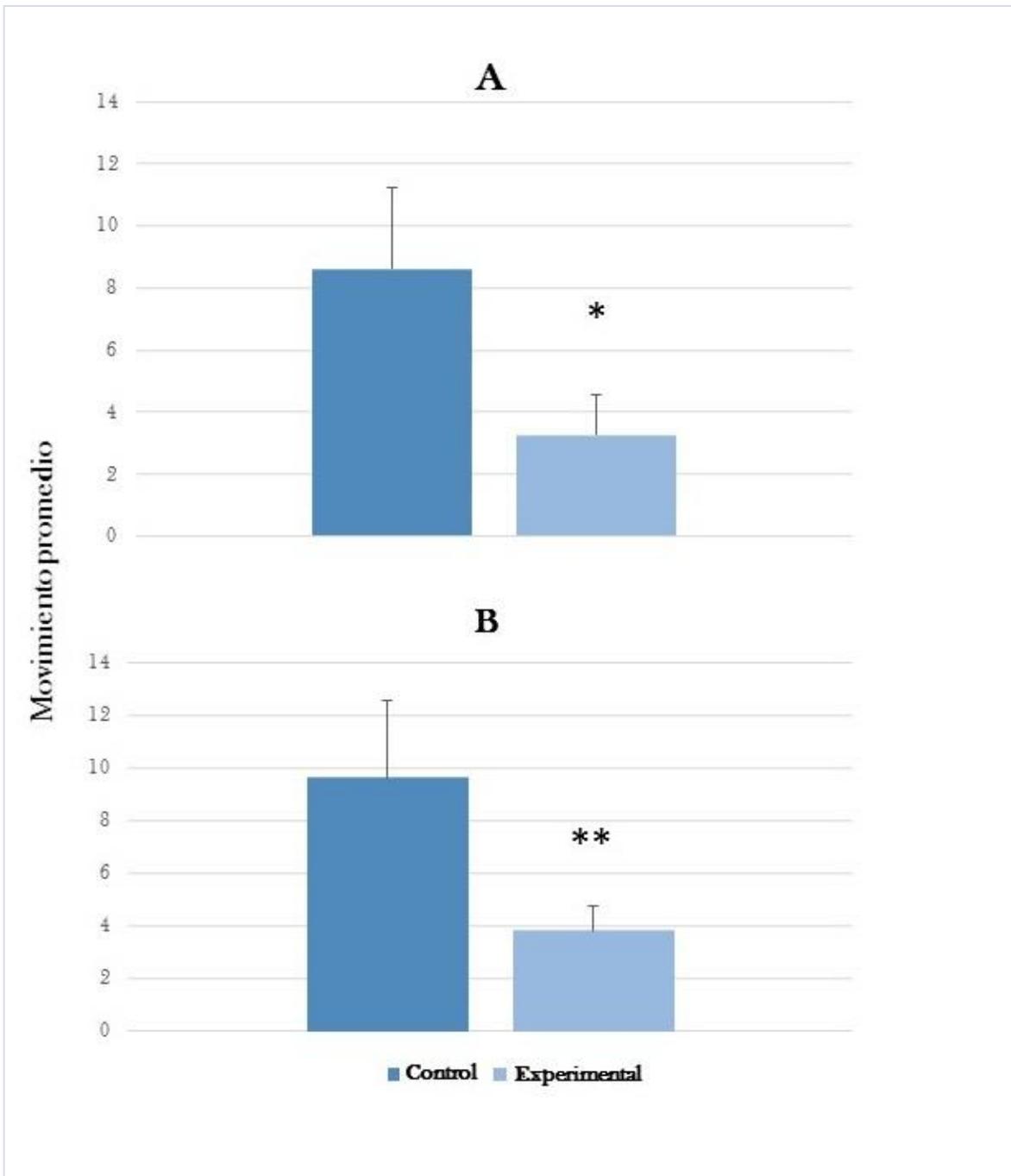


Figura 8. Promedio de movimiento de los grupos de organismos (controles y experimentales) monitoreados durante 72 horas en el primer (A) y segundo (B) muestreo. Las barras verticales representan el error estándar. ** y * representan la diferencia significativa $p < 0.05$ (Test- t- Student).

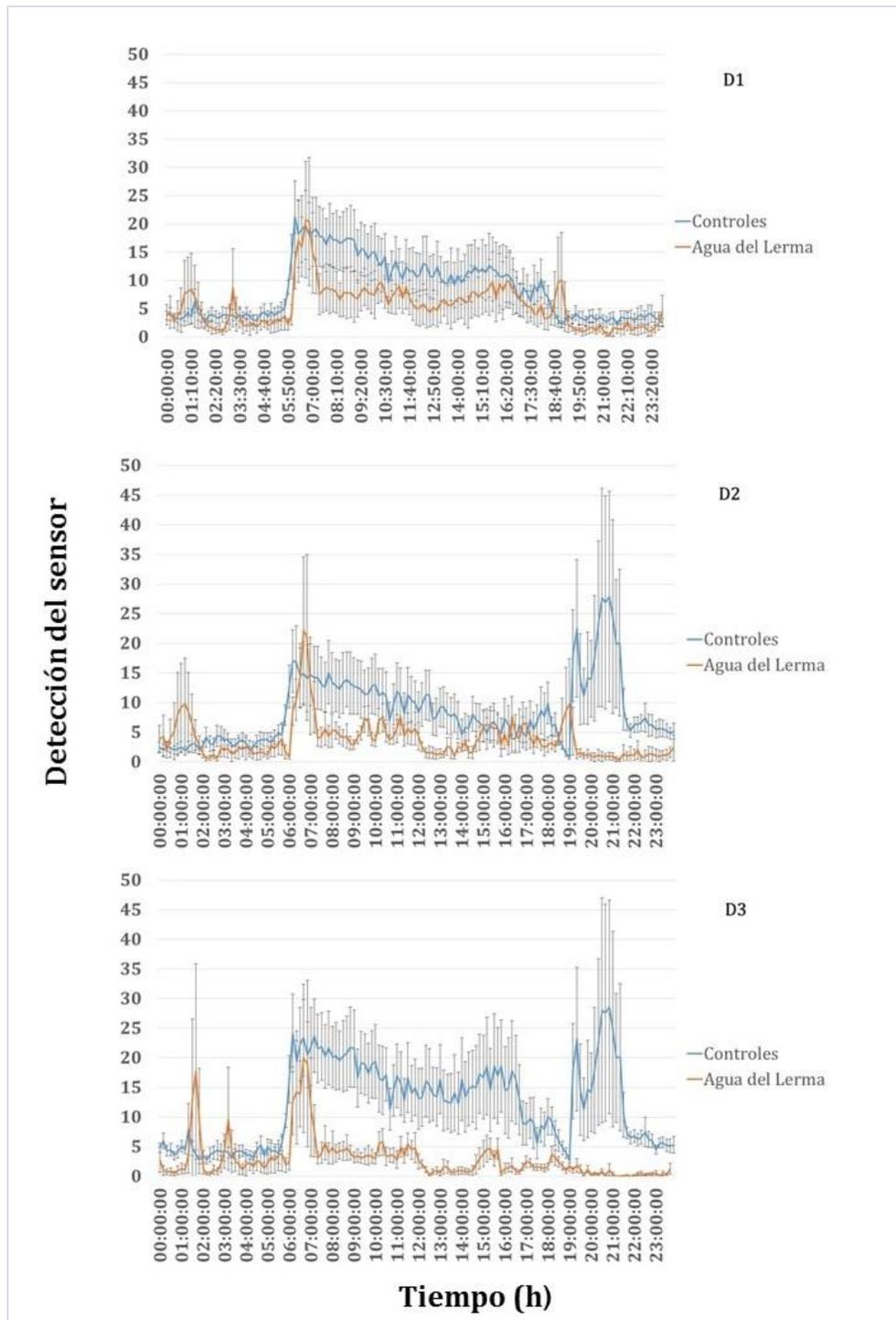


Figura 9. Perfiles de movimiento de los peces bajo registro de acuerdo a la detección del sensor durante las 24 horas en los tres días de la prueba (D1, D2, D3). Las barras verticales representan el error estándar. Diferencia significativa ($p < 0.05$) en el movimiento de ambos grupos (Controles y los peces expuestos al agua del Lerma).

6.4 Resultados de los análisis de tejidos

En la tabla 3, se muestran los resultados del contenido de metales en músculo, riñón, hígado y branquias del pez colectado en el cauce del río Lerma. La norma mexicana consultada (NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-027-SSA1-1993) solo establece los límites para cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb), de los cuales solo Cd y Pb fueron detectados y ciertas cantidades no rebasan el límite establecido por la norma. En la recopilación de los límites legales para sustancias peligrosas en pescado y productos pesqueros en diferentes países de la FAO (1983) se mencionan elementos como el arsénico (As), cadmio (Cd), cobre (Cu), plomo (Pb), selenio (Se) y zinc (Zn). En el caso del Cd, las concentraciones medidas en el riñón (0.13 mg/kg), hígado (0.07 mg/kg) y branquias (0.06 mg/kg) se encuentran por encima de lo establecido (0.05 mg/kg). Lo mismo sucede en el caso del Se donde las concentraciones encontradas en el músculo (0.33 mg/kg), riñón (1.14 mg/kg), hígado (0.96 mg/kg) y branquias (0.6 mg/kg) se encuentran por encima de lo establecido (0.05 mg/kg). Los otros elementos no se mencionan en ninguno de los dos lineamientos consultados.

6.5 Resultados de los análisis de agua

6.5.1 Parámetros fisicoquímicos medidos en campo.

Los parámetros fisicoquímicos medidos en campo durante los dos muestreos de agua en el Lerma se observan en la Tabla 4. De acuerdo a los criterios ecológicos de calidad de agua (CE-CCA 001/89) la temperatura del agua no debe exceder en 1.5°C la temperatura en condiciones naturales, para ambos muestreos de agua la temperatura no rebasó los 16°C. Los valores de pH obtenidos se encuentran dentro de la norma mexicana y de la EPA. El único valor que se encuentra fuera de los límites es el oxígeno disuelto, ya que ambas normas establecen un mínimo de 5 mg/L y los valores registrados para el primer y segundo muestreo son de 1.6 mg/L y 0.6 mg/L respectivamente.

Tabla 3. Concentraciones (mg/kg de peso) de los tejidos extraídos del pez colectado comparados con la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-027-SSA1-1993 y con los límites reportados por la FAO (1983). [-] Indica concentraciones < L.C o elemento no mencionado.

Elemento (mg/kg)	Músculo	Riñón	Hígado	Branquias	NOM-027	FAO	País
Al	3.7	8.3	3.5	92.0	-	-	-
As	0.14	0.34	0.24	0.20	-	1.00	Chile
B	0.21	0.52	0.14	0.09	-	-	-
Ba	0.20	0.15	0.03	20.44	-	-	-
Be	-	-	-	-	-	-	-
Bi	0.14	0.32	0.23	0.22	-	-	-
Ca	181	70.1	76.1	14293	-	-	-
Cd	0.04	0.15	0.07	0.06	0.50	0.05	Chile
Co	0.05	0.13	-	-	-	-	-
Cr	6.45	-	-	0.04	-	-	-
Cu	0.63	1.80	1.33	0.64	-	10.00	Chile
Fe	28.3	73.4	139	70.9	-	-	-
K	2645	2889	2765	1873	-	-	-
Mg	179	155	132	623	-	-	-
Mn	0.80	0.68	0.39	6.97	-	-	-
Mo	0.06	0.19	-	-	-	-	-
Na	312	1258	1002	1190	-	-	-
Ni	3.23	0.01	0.03	0.03	-	-	-
P	1238	2736	2040	9409	-	-	-
Pb	-	-	-	0.11	1	0.5	Canadá
S	1263	1835	1681	1340	-	-	-
Sb	0.03	0.05	0.05	0.06	-	-	-
Se	0.33	1.14	0.96	0.60	-	0.05	Chile
Si	10.71	9.4	6.1	28.8	-	-	-
Sr	0.48	0.26	0.30	70.96	-	-	-
V	0.32	0.29	0.22	1.16	-	-	-
Zn	5.78	79.2	58.3	94.1	-	100.0	Chile

Tabla 4. Parámetros medidos en campo durante el primer (1) y segundo (2) muestreo. (*) De acuerdo a la crianza de trucha.

Parámetros	1	2	CE- CCA 001/89	EPA
Temperatura (°C)	16.7	16.3	20-30°C *	-
pH	6.8	7.4	6.5-8.5*	6.6-8.3
Oxígeno disuelto	1.6 mg/L	0.6 mg/L	5 mg/L	5mg/L

6.5.2 Caracterización química de las muestras de agua: Aniones y Cationes.

Los resultados de análisis de aniones y cationes (metales y metaloides) de las muestras del agua colectadas en el río Lerma (lote 1) y las muestras de agua tomadas al final de la prueba de toxicidad (Lote 2) se muestran en la Tabla 5.

Es notable que una gran parte de los metales analizados no aparecen en ninguna de las normas consultadas.

- Aniones

Para los aniones, en cuanto a los fluoruros (F^-) y sulfatos (SO_4^{2-}) se encuentran fuera de los límites establecidos por la Norma Mexicana, para los SO_4^{2-} las concentraciones de las muestras varían de 158.7 mg/L hasta 356.8 mg/L cuando la concentración recomendada es de 0.005 mg/L. Para los F^- , la concentración recomendada es de 1 mg/L, y la concentración máxima detectada en una de las muestras es de 2.8 mg/L (Lote 2, muestreo 2). Todas las muestras se encuentran fuera del límite establecido de la EPA (0.01-0.03 mg/L) en cuanto a la concentración de PO_4^{3-} , en lo que corresponde al cloruro (Cl^-), las muestras de agua del segundo muestreo (2) sobrepasan los límites establecidos por la EPA 15 mg/L).

- Cationes

Las concentraciones de aluminio (Al^{3+}) del agua colectada durante el segundo muestreo (2) se encuentran por encima del límite (0.05 mg/L) permitido por la CE-CCA 001/89. Solo las muestras del Lote 1 sobrepasan el límite establecido por la EPA (0.75 mg/L), no se detectó Al en las primeras muestras de agua tomadas (1).

Las concentraciones de P (P^{3+} o P^{5+}) de todas las muestras (1 y 2), se encuentran fuera de ambas normas, con valores que oscilan desde 0.39 mg/L (Lote 1, muestreo 1) hasta 1.9 mg/L (Lotes 1 y 2, muestreo 2), cuando en las norma Mexicana y la EPA establecen límites de 0.0001 mg/L y 0.025 mg/L, respectivamente. Se observa un valor negativo de Ca^{2+} en las muestras 1, las muestras 2 presentan valores positivos de este elemento.

Tabla 5. Composición iónica total (mg/L) de las muestras de agua colectadas en el cauce del río Lerma. (-) Indica <L.C en el caso de las concentraciones o elemento no mencionado en las normas. *Efecto sobre bagre.

Parámetro	1			2		NORMAS	
	Lote 1	Lote 1	Lote 2	CE- CCA 001/89	EPA		
F⁻	1.2020	2.6928	2.8504	1	-		
Cl⁻	-	73.4596	83.8975	250	15		
NO₂⁻	66.5481	1.8103	0.2255	-	>400*		
Br⁻	-	-	-	-	-		
NO₃⁻	5.5978	83.7550	46.5616	-	-		
PO₄³⁻	5.9601	3.8435	4.0854	-	0.01 - 0.03		
SO₄²⁻	158.7193	316.8000	356.8000	0.005	-		
Al³⁺	-	1.1564	0.2196	0.05	0.75		
As^{3-, 3+, 5+}	-	0.0138	0.0166	0.2	0.34		
B^{3-, 3+}	0.0476	0.4338	0.4568	-	-		
Ba²⁺	0.0169	0.1217	0.1179		50		
Be²⁺	-	-	-	0.001	0.0053-0.13		
Bi^{-3, +3, +5}	-	-	-	-	-		
Ca²⁺	-4.6279	39.8200	42.8814	-	-		
Cd²⁺	-	-	-	(II)	0.00066		
Co^{2+, 3+, 4+, 5+}	-	0.0011	0.0005	-	-		
Cr^{+2, +3, +4, +5}	-	-	-	0.01	0.57 (III) 0.016(VI)		
Cu^{+, 2+}	-	-	-	-	0.0065		
Fe^{2+, 3+}	0.0293	0.5245	0.0882	1	1		
K⁺	3.0088	20.335	21.9567	-	-		
Li⁺	-	0.1070	0.1155	-	-		
Mg²⁺	1.7883	14.0359	14.4510	-	1-100		
Mn^{2+, 3+, 4+, 6+, 7+}	0.0192	0.1376	0.0015	-	-		
Mo^{2+, 3+, 4+, 5+, 6+}	0.0008	-	-	-	-		
Na⁺	13.0025	203.6135	217.0524	-	-		
Ni^{2+, 3+}	-	0.0103	0.0100	-	0.47		
P^{2-, 3-, 1+, 2+, 3+, 5+}	0.3997	1.9243	1.9170	0.0001	0.025		
Pb^{2+, 4+}	0.0025	0.011	0.011	-	0.065		
S^{2-, 2+, 4+, 6+}	7.3158	99.8837	104.6663	-	-		
Sb^{-3, +3, +5}	-	-	-	-	-		
Se^{2+,4+,6+}	-	-	-	0.008	0.26		
Si^{4-,2+,4+}	2.8512	26.4270	26.2336	-	-		
Sn^{2+,4+}	-	-	-	-	-		
Sr²⁺	0.0664	0.5290	0.5692	-	-		
Te^{2-,2+,4+,6+}	-	-	-	-	-		
Tl^{2+,3+,4+}	-	-	-	-	-		
V^{2+,3+,4+,5+}	0.0357	0.0103	0.0009	-	-		
Zn²⁺	0.0061	0.0117	-0.0051	-	0.12		

7. DISCUSIÓN

- Peroxidación lipídica

En este estudio, se evaluó la toxicidad del agua del río Lerma sobre la peroxidación lipídica de los peces cebra expuestos a ésta. Aunque las gráficas muestran una mayor producción de especies reactivas por parte de los peces del grupo experimental (Figura 4), los resultados, indican que no hay diferencia estadística entre los organismos del grupo control y el grupo experimental.

Casi todos los factores ambientales pueden influenciar en el grado al cual los peces responden a estresores. Los factores externos incluyen: aclimatación a la temperatura, hora del día, la longitud de la onda de luz, mientras que los factores internos son aquellos relacionados con el estado nutricional y su salud. En ciertos casos, hay otros factores que modifican el estrés y que son por si mismos crónicamente estresantes, como la mala calidad del agua o sustancias tóxicas (Barton, 2002). Considerando lo anterior, se puede decir que la mala calidad del agua del río Lerma (bajo contenido de oxígeno disuelto, turbiedad, así como los compuestos y elementos encontrados, que están por encima de las normas consultadas) e incluso el cambio de agua limpia (reconstituida) al agua del Lerma promovieron la producción de radicales libres en el grupo experimental y es por ello que en las gráficas se puede observar esta tendencia, aunque no haya una diferencia estadísticamente significativa. También es importante considerar que los peces no tenían la misma edad y esto pudo afectar los resultados, ya que se ha demostrado que la actividad enzimática antioxidante es dependiente de la edad, por lo que puede variar en un grupo de una edad a otra (Rundeva *et al.* 2010).

- Actividad de la AChE

Se sabe que la inhibición de la actividad de esta enzima puede causar, en primer lugar, hiperactividad, pérdida de coordinación, convulsiones y finalmente parálisis, además de otros cambios de comportamiento (Kuhr y Dorough 1976; Xuereb *et al.* 2009). Los resultados del bioensayo muestran que la actividad de la AChE

disminuyó para los peces expuestos al agua del Lerma en el primer muestreo (Figura 5 y 6), lo mismo ocurre en el movimiento de estos peces, ya que se mueven menos en comparación a los peces control, por lo que se observa una clara relación entre la baja actividad de la enzima y el poco movimiento de los organismos, sobre todo al paso de los días (Figura 9) donde el movimiento de los organismos control aumentó al día tres y el movimiento del grupo experimental fue disminuyendo. La disminución de la enzima podría ser la responsable del comportamiento de los peces expuestos (nulo movimiento).

En los peces expuestos al agua colectada durante el segundo muestreo, la actividad de la AChE fue mayor en comparación con los controles, aunque la diferencia fue relativamente pequeña, la actividad (movimiento) de los peces disminuyó, contrario a lo que se esperaba.

Pavlov (2012) mostró que condiciones de hipoxia y cambios de pH pueden promover el aumento de la actividad de la AChE, ese comportamiento también es observado cuando un pez es expuesto crónicamente a una o varias sustancias tóxicas y después es regresado a agua limpia. Los cambios de pH no fueron drásticos, pero las bajas concentraciones de oxígeno disuelto pudieron influir en la actividad de la AChE. Del mismo modo, al momento de cambiar los organismos de ambiente (de agua limpia al agua del Lerma) el agua del río era turbia debido al material suspendido en el agua, el cual al paso de las horas que duró el ensayo se depositó en el fondo del acuario: pasando de agua turbia a agua más clara. Dembelé *et al.* (1999) mostraron que, aunque después de un tiempo de exposición, y dado que los insecticidas son inhibidores irreversibles, la actividad de la AChE se puede recuperar, es decir, puede pasar por un periodo de inhibición, pero después de un tiempo puede recuperarse (el tiempo de recuperación varía entre especies de peces y compuesto al que han estado expuesto). También es bien sabido que cada organismo tiene la capacidad de adaptarse al estrés ambiental mediante la modificación del comportamiento (estimulación, aclimatación o ajuste del comportamiento) (Zhang *et al.* 2012). Lo anterior pudo suceder con los peces expuestos al agua del Lerma, los cuales

podieron pasar por un periodo corto de estrés y después se aclimataron a las condiciones del acuario en cuanto se sedimentaron las partículas suspendidas.

Para ambos muestreos, los peces control se movieron más que los organismos expuestos al agua del Lerma, en el primer muestreo si hubo una inhibición de la enzima lo que pudo provocar que los peces se movieran menos, mientras que en el segundo muestreo la actividad de la AChE para estos organismos incrementó. Sin embargo, durante el primer muestreo no se encontró diferencia significativa en cuanto a la actividad de la enzima, contrario a lo que sucedió en el último muestreo. El Al (en forma Al^{3+}) fue un elemento detectado en el agua del segundo muestreo y podría estar influyendo en el comportamiento del pez en cuanto a la actividad de la AChE y el movimiento. Resultados similares fueron obtenidos por Senger *et al.* (2011), donde se registró menor actividad de la AChE y disminución del movimiento en peces cebra expuestos al cloruro de aluminio ($AlCl_3$) en aguas con pH ácido, situación que podría estar asociada a la interacción alostérica entre el catión y el sitio anicónico periférico de la enzima (Gulya *et al.* 1990). Por el contrario, Brodeur *et al.* (2001), usando salmón del atlántico (*Salmo salar*), mostró que los niveles subletales de Al en aguas ácidas puede promover el incremento de la actividad locomotriz. Los resultados contrastantes en los trabajos antes mencionados indican que las diferencias en la respuesta de los organismos pueden variar entre especies y de acuerdo al nivel de toxicidad del Al en aguas con pH ácido (Senger *et al.* 2011). Sin embargo, en este trabajo, no se descarta la posible influencia del Al en el comportamiento de los organismos expuestos al agua del segundo muestreo.

- Tejidos del pez colectado

Varios metales se pueden acumular en diferentes cantidades en los cuerpos de los peces sin causar mortalidad. Esas diferencias resultan de la afinidad que tienen los metales a los tejidos de los peces, la toma del ambiente, la deposición y la tasa de excreción. Los niveles de metales en peces vivos usualmente siguen el siguiente orden: $Fe > Zn > Pb > Cu > Cd > Hg$. Entre más grande sea la concentración

de los metales en el ambiente, mayor será la cantidad que los peces podrán tomar y acumular (Jeziarska y Witeska, 2006).

El Cd está fuera de los límites permisibles reportados por la FAO (1983), el orden de concentración riñón>hígado>branquias, aunque la concentración de metales en los riñones es generalmente menor a las medidas en el hígado, se ha demostrado que el Cd y el Zn tienen afinidad por el riñón. Durante la depuración, los niveles de metal en los riñones permanecen altos e incluso pueden aumentar, lo que se relaciona con el papel de los riñones como órgano excretor (Jeziarska y Witeska, 2006).

El Se fue otro elemento que se encuentra fuera de los límites establecidos en las normas. Las principales formas en las que puede ser encontrado es como selenato (SeO_4^{2-}) asociado a los drenajes de irrigación provenientes de la agricultura y efluentes tratados de refinería de petróleo, como selenito (SeO_3), también asociado en efluentes de refinería de petróleo, efluentes de eliminación de cenizas (chimeneas); y, por último, en forma de organoselenio, como producto de drenajes agrícolas tratados (EPA, 2015). El orden de acumulación de Se en los tejidos y órganos analizados fue la siguiente: riñón> hígado>branquias > músculo. La vía más importante de la ingestión de Se es la digestiva (mediante la ingestión de alimentos), en la cual los productores primarios tales como las microfitas toman el Se en forma de oxianiones (selenito y selenato) así como selénidos orgánicos y lo transforman a organoselenio, posteriormente este compuesto será transferido a los consumidores primarios: zooplancton, bivalvos, larvas de insectos y peces, que finalmente serán comidos por depredadores de mayor tamaño como peces. Los efectos del Se en peces se observa en teratogénesis reproductiva y mortalidad larval (EPA, 2015). El Se en los riñones podría indicar que el pez no fue capaz de eliminarlo mediante la orina y es por ello que lo sigue reteniendo.

En las muestras de agua en el mismo punto donde el pez fue colectado no se detectó Se, podría deberse a que la fuente de emisión no se encuentra cerca del punto de muestreo ya que la toxicidad del Se en aguas con tiempos de residencia cortos, como los ríos y arroyos, tiende a acumularse y ser evidente únicamente río

abajo, lejos de la fuente (EPA, 2015), por lo que resultaría útil realizar análisis de agua para determinar la presencia de este elemento aguas arriba en la cuenca, esto daría un indicio de las posibles fuentes y la forma en la que el Se incorpora a la cadena alimenticia.

Resulta interesante hacer una comparación entre los cationes que no se mencionan en los lineamientos consultados y que se encuentran en concentraciones altas. Tal es el caso del Al encontrado en branquias>riñón>músculo>hígado, mismo que también fue encontrado en las muestras de agua. Aunque también podría asociarse a la toma de este elemento, ya que la mayor concentración se encuentra en las branquias, también es importante considerar que su concentración pudo verse afectada por el uso de una pinza de metal utilizada durante el manejo de los tejidos y órganos al momento de la extracción. Otros metales como el vanadio (V) también aparecen en pequeñas concentraciones en los tejidos siendo mayor en las branquias, siendo éstas las que se encuentran en contacto directo con el agua.

Sólo un pez fue colectado ya que se encontraba varado en rocas cercanas al punto de muestreo. Es necesario colectar más peces en diferentes puntos de la cuenca para establecer una relación clara de los metales presentes en agua y los metales presentes en los tejidos. Aunque no se puede determinar la causa específica de la muerte del pez colectado, el análisis de sus tejidos es un buen antecedente sobre los posibles efectos que podría estar teniendo la contaminación en los peces.

- Parámetros físico- químicos del agua

El contenido de oxígeno disuelto en las aguas proviene de: (1) actividades fotosintéticas y respiratorias de la biota en aguas abiertas, el bentos; y (2) el gradiente de difusión en la interfase agua-aire y la distribución de la mezcla hecha por el viento. Generalmente concentraciones de oxígeno disuelto (OD) menores a 3 mg/L generan estrés a los vertebrados acuáticos y a la gran mayoría de la vida acuática (Lind, 1979). Las concentraciones de OD del agua colectada en el río indican deficiencia de oxígeno, cercanas a condiciones anóxicas. Estas son más

bajas a las obtenidas por Brito *et al.* (2015) en puntos de muestreo ubicados en medio y a la salida de la ciudad de Salamanca, mismas que podrían estar relacionadas con el aporte de materia orgánica, predominantemente de origen humano como lo sugieren Lima-Mendoza y Mazari-Hiriart (2005). En 2009, la CONAGUA clasificó a Salamanca como fuertemente contaminado para DBO₅, DQO y/o SST. Sin embargo, es necesario realizar nuevos análisis de DBO₅ en diferentes puntos del río a su paso por esta ciudad para confirmar el origen de la contaminación. También debe considerarse que ambos muestreos se llevaron a cabo en época de estiaje, por lo que el nivel y la corriente del río disminuyeron provocando que se dé un mayor contacto con el suelo, que la materia orgánica y otros constituyentes del río se concentren y además aumente la cantidad de dióxido de carbono disuelto provocando así una disminución del oxígeno disuelto en el río (Beamish, 1964). A pesar de las condiciones de hipoxia, el pH de ambos muestreos, ligeramente ácido en el primer muestreo y casi neutro en el segundo, se mantuvo dentro de los límites establecidos por ambas normas consultadas.

- Aniones

Las concentraciones de los aniones: F⁻, Cl⁻, PO₄³⁻ exceden los límites establecidos en una o en ambos de los lineamientos consultados.

En medio acuático el flúor se encuentra mayoritariamente como ion fluoruro (F⁻), en cuerpos superficiales de agua dulce no contaminadas sus concentraciones generalmente oscilan entre 0.01 a 0.3 mg/L, aunque también concentraciones más altas pueden ser encontradas en regiones donde predomina la actividad volcánica o geotermal. En las muestras de agua colectadas los valores se encuentran por encima de los límites permitidos, se ha demostrado que los animales de agua dulce son más sensibles al F⁻ que otros organismos como algas, pues éste actúa como inhibidor de actividad enzimática, y en último término, interrumpiendo procesos metabólicos tales como la glucólisis e incluso la síntesis de proteínas (Kessabi, 1984; Camargo, 2003). Según lo anterior también podría pensarse que al ser un inhibidor de la actividad enzimática podría estar influyendo en la actividad de la AChE de los peces del grupo experimental.

Otros efectos como acumulación de F⁻ en esqueleto de peces también ha sido investigado (Camargo, 2003). Trabajos previos en la zona de estudio plantean la posible presencia de fluoruros y arsénico en los mantos acuíferos en la ciudad de Salamanca y otras poblaciones cercanas asociados a flujos geotérmicos (Rodríguez, *et al.* 2001), lo que sugiere que el aporte de estos iones al río puede tener origen geológico, no se descarta una aportación antropogénica.

Los fosfatos (PO₄³⁻) son la forma más abundante de fósforo en el ambiente (Aydin *et al.* 2010), aunque generalmente la concentración de fósforo (P) en aguas naturales no es mayor a 1 mg/L (Arredondo y Ponce, 1998; Gómez Márquez *et al.* 2011). Los aportes de P al río podrían ser consecuencia de fuentes antropogénicas tal como las derivadas del escurrimiento de aguas de campos de cultivo, descargas de aguas de origen agrícola, así como de lodos, resultado del cambio de uso de suelo y erosión, que son arrastrados en época de lluvia en el alto Lerma (Atlas Urbano Cuenca Lerma, 2002; pp.91).

Por otro lado, la forma más común de azufre en el agua es en sulfatos (SO₄²⁻), sus concentraciones pueden variar de acuerdo a la naturaleza geológica e hidrológica de la cuenca en la que se asienta el embalse, en aguas naturales su concentración puede oscilar entre 10 y 80 mg/L (Gómez Márquez *et al.* 2011). En el río, las altas concentraciones de SO₄²⁻ podrían deber su origen a las descargas de aguas residuales domésticas provenientes del alto Lerma, donde el río es utilizado (en diferentes puntos) como vertedero de aguas negras de origen doméstico o industrial (Atlas Urbano Cuenca Lerma, 2002; pp.90).

Los nitratos (NO₃⁻) y los nitritos (NO₂⁻), además del amonio (NH₄⁺), son los iones reactivos de nitrógeno inorgánico disueltos más comunes en ecosistemas acuáticos (Camargo y Alonso, 2006). Aunque en ninguna de las normas consultadas se mencionan los niveles de compuestos nitrogenados, Camargo y Alonso (2005) mencionan que concentraciones entre 0.08- 0.35 mg NO₂-N/L son adecuadas para proteger animales acuáticos sensibles, mientras que para NO₃⁻, según Camargo *et al.* (2005), concentraciones de hasta 10 mg/L puede afectar a los organismos acuáticos sensibles. La concentración de NO₂⁻ y NO₃⁻ de ambos muestreos

exceden las concentraciones recomendadas, situación que muestra el alto grado de contaminación del río en este punto. Se ha comprobado que la muerte extensiva de invertebrados y peces son probablemente la manifestación más dramática de hipoxia (o anoxia) en ambientes eutróficos e hipereutróficos, ya sea porque las bajas concentraciones de oxígeno disuelto promueven la formación de compuestos reducidos, tal como sulfuro de hidrogeno, y/o por la propagación de algas tóxicas (Camargo y Alonso, 2006). Los resultados obtenidos en cuanto a nitratos y fosfatos son diferentes a los obtenidos por Arteaga (2010), quien realizó la caracterización del agua de la cuenca Lerma-Chapala y concluye que al menos hasta ese año, los niveles de estos aniones no se consideraban perjudiciales.

Los aportes de aguas residuales domésticas e industriales, así como escurrimientos agrícolas y de granjas que se encuentran a lo largo del cauce desde el alto Lerma podrían estar promoviendo el incremento de estos compuestos (SO_4^{2-} , NO_2^- y NO_3^- y PO_4^{3-}) en el río, para comprobar lo anterior es necesario realizar muestreos para la determinación de éstos en diferentes puntos del río desde su nacimiento hasta el Lago de Chapala para determinar si hay una variación espacial.

- Cationes

En las normas consultadas se consideran como prioritarios metales como el mercurio, arsénico, cadmio y plomo debido a su alta toxicidad. Ninguna de las concentraciones de estos metales en ambos muestreos fueron detectadas o no exceden los límites permisibles establecidos.

El aluminio (Al) fue de los metales cuantificados y sus concentraciones se encontraron fuera de la norma. Este, puede ser encontrado en la naturaleza disponible en minerales aluminosilicatados en los suelos, es liberado naturalmente al ambiente por la erosión de rocas y suelos, aunque también puede ser asociado a actividad volcánica (Wang, Liand y Zhuang, 2013).

La materia orgánica disuelta puede incrementar la solubilidad del Al pero disminuye su toxicidad, debido a que forma complejos con el Al disminuyendo la

cantidad en solución de éste y que puede unirse a las branquias. Es tóxico para peces adultos, causa efectos ionoregulatorios y respiratorios, dependiendo del pH del agua y de las concentraciones de Al. Los efectos ionoregulatorios suceden a pH bajo, donde el Al tiene el mismo mecanismo de toxicidad que el H⁺, esto es, el desplazamiento del calcio de las barreras de difusión de la membrana branquial y la interferencia de la actividad celular de la bomba sodio-potasio (Na⁺-K⁺-ATPasa). Por otro lado, los efectos respiratorios predominan a pH moderadamente ácido (pH ~5 a 6), debido a la precipitación o polimerización de Al como ácidos, el agua rica en Al pasa dentro del microambiente de las branquias, el cual es más básico debido a la cantidad de amonio liberado en las branquias de los peces (Gensemer y Playle, 1999). Este metal, es relativamente insoluble en pH de 6 a 8, pero su solubilidad incrementa a condiciones más ácidas o más alcalinas. Los complejos de Al, principalmente con los hidroxilos y los fluoruros son las especies de Al más importantes en aguas naturales.

La presencia de calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), Potasio (K), a excepción del Ca, aunque no se mencionan en las normas, es normal, ya que son los principales cationes encontrados en aguas naturales como resultado del intemperismo químico de las rocas (Nikanorov y Brazhnikova, 2009). La concentración de Ca negativa determinada en el primer muestreo puede deberse a una contaminación del blanco.

Por otro lado otros metales como vanadio (V) también fueron cuantificados en ambos muestreos (0.0357 mg/L y 0.0103 mg/L, respectivamente). La concentración de V en aguas naturales es relativamente baja y usualmente oscila entre 0.5 -2.5 µl/L (0.0002 mg/L - 0.005 mg/L) (Colina *et al.* 2005). Su origen, principalmente, parece derivado de la erosión de rocas silicatadas (Shiller y Mao, 2000), mientras que la principal fuente antropogénica a la que está asociado es la combustión de hidrocarburos (Mejía *et al.* 2007).

En Salamanca, se ha reportado la presencia de V en el acuífero, mismo que podría estar relacionado a las emisiones particuladas provenientes de la planta termoeléctrica, que utiliza combustible N° 6 o combustóleo -como es conocido

localmente (Mejía *et al.* 2007) y que se caracteriza por su alto contenido de azufre y vanadio (Salinas *et al.*, 2001). El V en suelos urbanos es consecuencia de la constante deposición de partículas, que una vez en el suelo, pueden pasar a través de formaciones permeables, ya sea por el agua de lluvia, agua de irrigación, fugas de aguas residuales, etc. y finalmente llegar a los cuerpos de agua como los acuíferos (Rodríguez *et al.* 2016). Aunque minerales contenedores de V no han sido reportados en el área (Mejía *et al.* 2007), no se descarta un origen geológico.

El estroncio (Sr), es otro metal que también fue encontrado en las muestras tomadas. Su concentración en el segundo muestreo fue más alta (0.5290 mg/L) con respecto al primer muestreo (0.0664 mg/L). Naturalmente se encuentra en cuerpos de agua en concentraciones bajas de 1 ppm (1 mg/L) o menos (Skougstadt y Horr, 1960), y su origen también está asociado a la erosión de rocas silicatadas (Wadleigh *et al.* 1985).

Otro metal cuantificado en el segundo muestreo fue el litio (Li) que en aguas superficiales puede encontrarse en concentraciones típicamente bajas, usualmente menores a 0.04 mg/l asociadas a cuestiones geológicas. Aunque la concentración fue relativamente baja (0.1070 mg/L), se ha demostrado que a concentraciones de hasta 0.15 mg/l puede afectar la alimentación de *E. clavaeformis*, según estudios realizados en laboratorio (Kszos y Stewart, 2003). Aunque para la mayoría de las aguas naturales, la presencia de suficiente Na previene la toxicidad del Li (Kszos y Stewart, 2003).

Debido a que las muestras de agua fueron tomadas en un solo punto, no se puede representar el contenido de los elementos y compuestos encontrados para todo el río. Si se quiere conocer mejor la composición del agua del río en la ciudad de Salamanca, es deseable realizar un muestreo en diferentes puntos de la ciudad (antes de entrar a la ciudad, en medio y al final), lo que permitirá establecer una relación con los compuestos encontrados y sus fuentes.

La suma de estos factores provocó que los peces expuestos al agua del río Lerma presentaran mayor grado de estrés que los organismos control, misma condición

se vio reflejada en la inhibición de la actividad de la AChE del agua colectada durante el primer muestreo, donde las concentraciones de P, además de estar asociadas a los PO_4^{3-} , también podrían sugerir la presencia de insecticidas organofosforados producto de la agricultura en el agua. El aumento de la actividad de la AChE de los peces expuestos al agua colectada en el segundo muestreo podría atribuirse al estrés provocado por las bajas concentraciones de OD y al cambio de la calidad de agua provocada por la sedimentación de las partículas en suspensión de los acuarios. Para ambos casos, los peces control se movieron más que los peces expuestos al agua del Lerma (figura 8 y 9).

En el caso de los tejidos, y de los metales prioritarios, solo el Cd se excedió los límites permisibles por la norma, su concentración alta en riñones está asociada a la afinidad de este metal por ese órgano. Lo mismo sucede con el Se, ambos metales asociados a actividades antropogénicas. Es necesario realizar una colecta de más peces a lo largo de la cuenca para comprobar posible bioacumulación de estos metales en los tejidos de peces. La colecta de este ejemplar es una muestra de los posibles efectos que podría estar teniendo la contaminación del agua del río sobre los peces.

Para conocer mejor la composición del agua del río en la ciudad de Salamanca se recomienda realizar muestreos en diferentes puntos de la ciudad (antes de entrar a la ciudad, en medio y al final), en diferentes épocas del año, mismo que permitirá establecer una relación con los compuestos encontrados y sus fuentes.

8. CONCLUSIONES

- La exposición del pez cebra a agua del Río Lerma colectada en las inmediaciones de la ciudad de Salamanca, provoca incremento en el estrés oxidativo y decremento en la actividad locomotriz.
- La actividad enzimática de la acetilcolinesterasa en los tejidos del pez cebra fue opuesta entre las dos temporadas de bioensayos, se desconoce la causa de ello.
- Los análisis de agua mostraron como principales rasgos contaminantes del río Lerma en la ciudad de Salamanca: bajas concentraciones de OD y niveles por encima de los límites permisibles de: Al, P, F, Cl⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻.
- Se desconoce la presencia de otro tipo de contaminantes orgánicos que hubieran podido influir sobre los resultados del bioensayo.

9. PERSPECTIVAS

Es necesario realizar estudios de agua (cationes, aniones e pesticidas) en varios puntos del río, así como en diferentes temporadas de año, tanto en la ciudad de Salamanca como río arriba, esto con el fin de determinar las fuentes de emisión.

Debido a los metales encontrados en los tejidos del pez colectado, se sugiere hacer un muestreo de un mayor número de peces, así como de otros organismos, algas, por ejemplo, para construir un panorama más completo sobre los efectos de la contaminación del río Lerma sobre los organismos del área de estudio.

Este trabajo muestra un panorama muy reducido de los efectos que está teniendo la contaminación del río Lerma sobre organismos sanos y sobre peces de la región, sin embargo, abre una brecha para la realización de futuras investigaciones tanto en el área científica como en el área social, es decir, los posibles efectos que está teniendo el problema de la contaminación sobre los asentamientos humanos establecidos a lo largo del cauce del río.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro C., A.,E.,C.,(2013). *Patrón temporal de actividad locomotora de la araña Scytodes globula (Araña tigre)*. (Tesis de licenciatura).Universidad de Chile. Chile Disponible en: ([http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131474/Patron-temporal-de-actividad-locomotora-de-la-arana-Scytodes-globula-\(arana-tigre\).pdf?sequence=1](http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131474/Patron-temporal-de-actividad-locomotora-de-la-arana-Scytodes-globula-(arana-tigre).pdf?sequence=1)).
- Al-Nagaawy, A. M. (2008). Accumulation and elimination of copper and lead from *O. niloticus* fingerlings and consequent influence on their tissue residues and some biochemical parameters. In *8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Egypt* (Vol. 1, pp. 431-445).
- Álvarez Garzón, C. (2011), efectos teratogénicos del nitrato de plomo en el desarrollo embrionario del pez cebra *Danio rerio* (Hamilton, 1822) a cinco dosis subletales (Tesis de Licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
- Andersen, L., Petersen, G. I., Gessbo, Å., Örn, S., Holbech, H., Bjerregaard, P., & Norrgren, L. (2001). Zebrafish *Danio rerio* and roach *Rutilus rutilus*: Two species suitable for evaluating effects of endocrine disrupting chemicals?. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 4(3), 275-282.
- Arredondo, F. J. L. y Ponce, P. J. T. 1998. Calidad del agua en acuicultura. Conceptos y aplicaciones. AGT Editores, México, 222 p.
- Arteaga Cortez, V. (2010). Calidad de Aguas Residuales de la cuenca Lerma- Chapala (Tesis de Maestría). Colegio de Postgraduados. México.
- Austin, B. (1998). The effects of pollution on fish health. *Journal of applied microbiology*, 85(S1).
- Aschoff, J. (1984). Circadian timing. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 423(1), 442-468.
- Avelar-González, J.F., Flores-Tena, F., Medina- Ramírez, I.E. (2008). "Contaminación del agua". Universidad de Aguascalientes. En Jaramillo, F.,(Ed.). Toxicología Ambiental (pp. 103- 113). ISBN 978-607-7745-26-6.
- Avila-Pérez, P., Zarazúa, G., Carapia, L., Tejeda, S., Barceló-Quintal, I., & Martínez, T. (2011). Concentration of elements in suspended matter discharges to Lerma River, Mexico. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 287(2), 383-391.

- Aydin, I., Aydin, F., & Hamamci, C. (2010). Phosphorus Speciation in the Surface Sediment and River Water from the Orontes (Asi) River, Turkey. *Water Environment Research*, 82(11), 2265-2271.
- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and comparative biology*, 42(3), 517-525.
- Beamish, F. W. H. (1964). respiration of fishes with special emphasis on standard oxygen consumption: IV. Influence of carbon dioxide and oxygen. *Canadian Journal of Zoology*, 42(5), 847-856.
- Bradford, M., 1976. A Rapid Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72,248-254.
- Brito, E. M., De la Cruz Barrón, M., Caretta, C. A., Goñi-Urriza, M., Andrade, L. H., Cuevas-Rodríguez, G., & Guyoneaud, R. (2015). Impact of hydrocarbons, PCBs and heavy metals on bacterial communities in Lerma River, Salamanca, Mexico: Investigation of hydrocarbon degradation potential. *Science of The Total Environment*, 521, 1-10
- Brodeur, J. C., Økland, F., Finstad, B., Dixon, D. G., & McKinley, R. S. (2001). Effects of subchronic exposure to aluminium in acidic water on bioenergetics of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(3), 226-234.
- Cairns Jr, J., & Dickson, K. L. (1971). A simple method for the biological assessment of the effects of waste discharges on aquatic bottom-dwelling organisms. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 755-772.
- Camargo, J. A. (2003). Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. *Chemosphere*, 50(3), 251-264.
- Camargo, J. A., Alonso, A., & Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 58(9), 1255-1267.
- Camargo, J. A., & Alonso, Á. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment international*, 32(6), 831-849.
- Camean, A. (1995). Toxicología avanzada. 1st ed. [ebook] Madrid: Diaz de Santos, pp.120, 121. Disponible: _____ at:

https://books.google.com.mx/books?id=opad2FFk9g0C&dq=esterasa+tipo+b&source=gbs_navlinks_s [Consultado: 7 Feb. 2017].

Cardona Mena, D. (2008). Neurotoxicidad de los organofosforados: efectos a corto y a largo plazo del clorpirifos. 1st ed. [en línea] Almería, p.120. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?id=ZeZAAQAAQBAJ&dq=Inhibici%C3%B3n+de+AChE+como+indicador&source=gbs_navlinks_s [Consultado: 28 Feb. 2017].

Catala, A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 157, 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.09.004>.

Catala, A. (2012), Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. En Repetto, M., Semprime, J., Boveris A. Eds. Lipid Peroxidation. Coacia. Intech, pp. 3-11.

Cardona Mena, D. (2008). Neurotoxicidad de los organofosforados: efectos a corto y a largo plazo del clorpirifos. 1st ed. [en línea] Almería, p.120. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?id=ZeZAAQAAQBAJ&dq=Inhibici%C3%B3n+de+AChE+como+indicador&source=gbs_navlinks_s [Consultado: 28 Feb. 2017].

Cotler, A. Mazari, H., De Anda. S. 2006. Atlas de la cuenca del Lerma- Chapala, Construyendo una visión conjunta. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México. P. 124.

Colina, M., Gardiner, P. H. E., Rivas, Z., & Troncone, F. (2005). Determination of vanadium species in sediment, mussel and fish muscle tissue samples by liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 538(1), 107-115.

Comisión Nacional de Agua. Normas Oficiales Mexicanas en materia de Agua. (no dice año). Consultada en Enero del 2017. Disponible en: <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Publicaciones/Publicaciones/SGAA-15-13.pdf>

Comisión Nacional del Agua (2014). Estadísticas del agua en México. Consultada en Junio de 2016. Disponible en: <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Publicaciones/Publicaciones/EAM2014.pdf>

Conti, M. E., & Cecchetti, G. (2003). A biomonitoring study: trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal areas. *Environmental Research*, 93(1), 99-112.

- De la Cruz Barrón, M. (2012). Aislamiento de bacterias Hidrocarbonoclastas de un sitio contaminado con petróleo y grasas. Universidad de Guanajuato (Tesis de Licenciatura). Guanajuato, Gto.
- Dembélé, K., Haubruge, E., & Gaspar, C. (1999). Recovery of acetylcholinesterase activity in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) after inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 62(6), 731-742.
- Doherty, V. F., Ogunkuade, O. O., & Kanife, U. C. (2010). Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in some selected fishes in Lagos, Nigeria. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*, 7(3), 359-365.
- Dural, M., Göksu, M. Z. L., & Ozak, A. A. (2007). Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. *Food chemistry*, 102(1), 415-421.
- Ebrahimi Yazdanabad, T., Emtyazjoo, M., Ghavam Mostafavi, P., & Sahebi, Z. (2014). Evaluation of copper and vanadium concentration in the soft tissue of *Tylosurus crocodilus* in Bahregan region, Persian Gulf. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 26(2), 92-98.
- Eisler, R. 1985b. *Selenium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review*. U.S. Fish and Wildlife Service. Biological Report 85 (1.5). Report No. 5.
- Eisler, R. 1991. *Cyanide hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review*. U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep. 85(1.23).
- Eisler, R., & Wiemeyer, S. N. (2004). Cyanide hazards to plants and animals from gold mining and related water issues. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 21-54). Springer New York.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 881-905.
- Eriksson, L. O., & Veen, T. V. (1980). Circadian rhythms in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* (Teleostei). Evidence for an endogenous rhythm in feeding, locomotor, and reaction time behaviour. *Canadian journal of Zoology*, 58(10), 1899-1907.
- Escobar, B. (2006). La cuenca Lerma-Chapala El agua de la discordia. *Gestión y Política Pública*, Sin mes, 369-392.

- Evans, D. and B. Claiborne, J. (2017). *The Physiology of Fishes*. 3rd ed. [ebook] Washington, USA.: Taylor and Francis group, pp.6-14. Available at: <https://www.crcpress.com/The-Physiology-of-Fishes-Third-Edition/Evans-Claiborne/p/book/9780849320224#googlePreviewContainer> [Fecha de consulta: 8 Mar. 2017].
- Fassiano, A. V., Ortiz, N., & Ríos de Molina, M. D. C. (2012). Estrés oxidativo en cefalópodos: I. Determinación de TBARS. *Acta toxicológica argentina*, 20(2), 57-61.
- Förstner, U. and Wittmann, G. (1979). *Metal Pollution in the Aquatic Environmen*. 1st ed. [ebook] Heidelberg, Alemania.: Springer, p.1. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=jnfpCAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=inauthor:%22U.+F%C3%B6rstner%22&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjK0JHlzMnSAhUG7CYKHb3WAm0Q6AEIGzAA#v=onepage&q&f=false> [Accessed 1 Mar. 2017]
- Gensemer, R. W., & Playle, R. C. (1999). The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Critical reviews in environmental science and technology*, 29(4), 315-450.
- Giller S. & Malmqvist B. (1999). *The biology of Streams and Rivers*. Nueva York: Oxford University Press.
- Gobierno del Estado de México. Atlas ecológico de la cuenca hidrográfica del río Lerma. Tomo VII. Urbano. Comisión Coordinadora para la recuperación Ecológica de la Cuenca del río Lerma, 2002. pp 22,23, 90.
- Gómez Márquez, J.L; Blancas Arroyo, G.A., Constanzo Casillas. (2011). Manual de análisis de aguas naturales y su aplicación a la microescala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Disponible en: http://132.248.60.110:8081/fesz_website_2011/wp-content/uploads/2012/09/ecocuan_aguas.pdf
- Gupta, R. C. (Ed.). (2011). *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds*. Academic Press.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219(1), 1–14.
- Heath A.G, (1995). *Water Pollution and Fish phisiology*. Tipos de contaminación de agua (pp.2-3). Disponible en:https://books.google.com.mx/books?id=5NPVTuBtGF4C&dq=Cyanides+and+water+polluti+on&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s

- Hill, A. J., Howard, C. V., and Cossins, A. R. (2002). Efficient embedding technique for preparing small specimens for stereological volume estimation: Zebrafish larvae. *J. Microsc.* 206, 179–181.
- Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences*, 86(1), 6-19.
- Hope, B. K. (1997). An assessment of the global impact of anthropogenic vanadium. *Biogeochemistry*, 37(1), 1-13.
- INECC-CCA, (2010). *MANUAL DE MÉTODOS DE MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS DE LAS SUSTANCIAS PRIORITARIAS PARA LAS MATRICES PRIORITARIAS DEL PRONAME*. [En línea] Instituto Nacional de Ecología, México, 2012.p. 55. Disponible en: http://www2.inecc.gob.mx/dgcenica/proname/informes/manual_de_metodos_de__muestreo_i_necc_2013.pdf
- Instituto Nacional de Ecología. *Ensayos ecotoxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo, La experiencia de México*. [en línea], Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Enero 2008. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/download/573.pdf>
- Jaramillo J. F., Rodríguez V.,M.L., Camargo M., M.E, Aldana M. M.L. (2008). Toxicología de los Plaguicidas. En *Toxicología Ambiental* (289-300). Aguascalientes, México.: Universidad Autónoma de Aguascalientes
- Jarvie, H. P., Neal, C., & Withers, P. J. (2006). Sewage-effluent phosphorus: a greater risk to river eutrophication than agricultural phosphorus?. *Science of the Total Environment*, 360(1), 246-253.
- Jezierska, B., & Witeska, M. (2006). The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters. In *Soil and water pollution monitoring, protection and remediation* (pp. 107-114). Springer Netherlands.
- Kessabi, M. (1984) Metabolisme et biochimie toxicologique du fluor: Une revue. *Revue de Medicine Veterinaire*, 135, 497–510.
- Kuhr, R. J., & Dorough, H. W. (1976). *Carbamate insecticides: chemistry, biochemistry, and toxicology*. CRC Press, Inc.

- Kszos, L. A., Beauchamp, J. J., & Stewart, A. J. (2003). Toxicity of lithium to three freshwater organisms and the antagonistic effect of sodium. *Ecotoxicology*, 12(5), 427-437.
- Kszos, L. A., & Stewart, A. J. (2003). Review of lithium in the aquatic environment: distribution in the United States, toxicity and case example of groundwater contamination. *Ecotoxicology*, 12(5), 439-447.
- Kwong, T. C. (2002). Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Therapeutic drug monitoring*, 24(1), 144-149.
- Lammer, E., H.G. Kamp, V. Hisgen, M. Koch, D. Reinhard, E.R. Salinas, K. Wendler, S. Zok, Th. Braunbeck. 2009. Development of flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the Zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology in Vitro*. 23:1436-1442.
- Lima, A.J., y M. Mazari. 2005. Evaluación bacteriológica de la calidad de agua en el río Lerma. México: Instituto de Ecología (INE)- UNAM.
- Lind, O. T. (1979). *Handbook of common methods in limnology*. The CV Mosley Company.
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E., Pascariello, M. F., Marinosci, L., & Schettino, T. (2003). Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine Pollution Bulletin*, 46(3), 324-330.
- Lampert, W., Sommer U.(1997). *Limnoecology: The ecology of lakes and streams*. Nueva York: Oxford University press.
- LENNTECH (1998-2017). Lithium (Li) and water. Rotterdam, Netherlands. Recuperado de: <http://www.lennotech.com/periodic/water/lithium/lithium-and-water.htm>.
- Luna, F., Antinuchi, C. DANIEL, & Busch, C. (2000). Ritmos de actividad locomotora y uso de las cuevas en condiciones seminaturales en *Ctenomys talarum* (Rodentia, Octodontidae). *Revista chilena de historia natural*, 73(1), 39-46. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2000000100005>
- Mainstone, C. P., & Parr, W. (2002). Phosphorus in rivers—ecology and management. *Science of the Total Environment*, 282, 25-47.

- Martínez G., F. y Rico M, R. (2008). Ecotoxicología Acuática. In: F. Jaramillo, A. Rincón and R. Rico, ed., *Toxicología Ambiental*, 1st ed. México: Universidad Autónoma de Aguascalientes, pp.151-162.
- Mejía, J. A., Rodríguez, R., Armienta, A., Mata, E., & Fiorucci, A. (2007). Aquifer vulnerability zoning, an indicator of atmospheric pollutants input? Vanadium in the Salamanca aquifer, Mexico. *Water, air, and soil pollution*, 185(1-4), 95-100.
- Mercado-Silva, N., J. Lyons, E. Díaz-Pardo, A. GuitierrezHernández, C.P. Ornelas-García, C. Pedraza-Lara & J. Vander Zanden. 2006a. Long-term changes in the fish assemblage of the Laja River, Guanajuato, central Mexico. *Aquat. Conservat. Mar. Freshwat. Ecosyst.* 16: 533-546.
- Nauen, Cornelia E & Food and Agriculture Organization of the United Nations (1983). *Compilation of legal limits for hazardous substances in fish and fishery products*. F.A.O, Rome
- Nieves G., M; Barrenetxea O., C.; Pérez S., A; Alfayate B. M; Rodríguez, V., F.J. (2004) *Contaminación ambiental: una visión desde la química*. Paraninfo. Pp. 63-65. (Consultado 16 feb. 2017).
- Nikanorov, A.M., Brazhnikova, L.V., 2009. Water chemical composition of rivers lakes, and wetlands. In *Types and Properties of Water, Encyclopedia of Life Support System, Vol II*. EOLSS-UNESCO, <http://www.eolss.net/>.
- Ochoa Cardona, D. M., & González Mantilla, J. F. Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia; Vol. 55, núm. 2 (2008); 115-126 Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia; Vol. 55, núm. 2 (2008); 115-126 2357-3813 0120-2952*.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO). (2003) *Primer informe de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo: Agua para todos, Agua para la vida*. 1st.ed. París, Francia. Ministerio del Medio Ambiente, España. Disponible en: <http://unesdoc.unesco.org/images/0014/001494/149406s.pdf> [Consultado 12 mayo. 2016].

- Palmer, M. R., & Edmond, J. M. (1992). Controls over the strontium isotope composition of river water. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(5), 2099-2111.
- Pavlov, D. F. (2012). Stress-induced dynamics of fish brain Acetyl choline esterase activity
- Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W., & Fancey, L. L. (1996). Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*, 32(2), 225-231.
- Peña, C., Carter, D., & Ayala-Fierro, F. (2001). *Toxicología ambiental Evaluación de riesgos y restauración ambiental. Hazardous Waste* (p. 204). Recuperado de:
<http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>
- Podolska, M., & Napierska, D. (2006). Acetylcholinesterase activity in hosts (herring *Clupea harengus*) and parasites (*Anisakis simplex* larvae) from the southern Baltic. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 63(1), 161-168.
- Rainbow, P. S. (1995). Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 31(4-12), 183-192.
- Ramírez, J. A., & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 4(2), 67-75
- Rauf, A., Javed, M., & Ubaidullah, M. (2009). Heavy metal levels in three major carps (*Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhina mrigala*) from the river Ravi, Pakistan. *Kidney*, 2(1.25b), 4-43.
- Regoli, F. (2000). Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 50(4), 351-361.
- Repetto, M., Semprine, J., & Boveris, A. (2012). Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In *Lipid peroxidation*. InTech..DOI: 10.5772/45943.
- Repetto, M., Boveris, A. (2010) Bioactivity of sesquiterpenes: novel compounds that protect from alcohol-induced gastric mucosal lesions and oxidative damage. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 106156231389-5575
- Rodríguez, R., Morales-Arredondo, I., & Rodríguez, I. (2016). Geological Differentiation of Groundwater Threshold Concentrations of Arsenic, Vanadium and Fluorine in El Bajío Guanajuatense, Mexico. *Geofísica internacional*, 55(1), 5-15.

- Rozo, J. C., & Caredenal, L. Y. R. (2013). Microorganismos, enzimas, plásmidos y genes involucrados en la degradación de plaguicidas n-metilcarbamatos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 105-119.
- Rudneva, I. I., Skuratovskaya, E. N., Kuzminova, N. S., & Kovyrshina, T. B. (2010). Age composition and antioxidant enzyme activities in blood of Black Sea teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(2), 229-239.
- Salinas, V., Diego, A., & Porcado, J. (2001). Uso de crudo maya despuntado como combustible alternativo al combustóleo. *Boletín IIE*, 25, 25.
- Sánchez-Vázquez, F. J., Madrid, J. A., Zamora, S., Iigo, M., & Tabata, M. (1996). Demand feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: dual and independent phasing. *Physiology & behavior*, 60(2), 665-674.
- Scaglione, M., Gervasoni, S., Garbe, N., Marozzi, M., & Cerutti, R. (2014). ritmos circadianos de actividad locomotora en *Rhamdia quelen*. *fave Sección Ciencias Veterinarias*, 13(1/2), 72-83.
- Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (1989). Criterios Ecológicos de Calidad del Agua CE-CCA-001/89, Diario Oficial de la Federación. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4837548&fecha=13/12/198
- Sedeño-Díaz, J. E., & López-López, E. (2007). Water quality in the Río Lerma, Mexico: an overview of the last quarter of the twentieth century. *Water Resources Management*, 21(10), 1797-1812.
- Senger, M. R., Seibt, K. J., Ghisleni, G. C., Dias, R. D., Bogo, M. R., & Bonan, C. D. (2011). Aluminum exposure alters behavioral parameters and increases acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Cell biology and toxicology*, 27(3), 199-205.
- Shiller, A. M., & Boyle, E. A. (1987). Dissolved vanadium in rivers and estuaries. *Earth and planetary science letters*, 86(2-4), 214-224.
- Shiller, A. M., & Mao, L. (2000). Dissolved vanadium in rivers: effects of silicate weathering. *Chemical Geology*, 165(1), 13-22.
- Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., & Gupta, R. (2011). Heavy metals and living systems: an overview. *Indian journal of pharmacology*, 43(3), 246.

- Skougstadt, M. W., & Horr, C. A. (1960). Occurrence of strontium in natural water. *Geological Survey*.
- Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., & Hankemeier, T. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, 3(3), 211-221.
- Sprague, J. B., Holdway, D. A., & Stendahl, D. O. U. G. L. A. S. (1978). Acute and chronic toxicity of vanadium to fish.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. In *Molecular, clinical and environmental toxicology* (pp. 133-164). Springer Basel.
- US. Environmental Protection Agency (EPA) (2015). Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria for Selenium- Freshwater, USA. Disponible en: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P100MZGX.PDF?Dockey=P100MZGX.PDF>
- US. Environmental Protection Agency (EPA) (2016). Ecological Toxicity Information, USA. Disponible en: <https://archive.epa.gov/reg5sfun/ecology/web/html/toxprofiles.html>
- United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science. (2016). *Determination of Metals by ICP-MS and ICP-OES (Optical Emission Spectrometry)*. Disponible en: <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/b9a63ea1-cae9-423b-b200-36a47079ae49/CLG-TM3.pdf?MOD=AJPERES>
- Valavanidis, A. & Vlachogianni, T.(2010). Integrated biomarkers in aquatic organisms as a tool for biomonitoring environmental pollution and improved ecological risk assessment. *Sci. Adv. Environ. Toxicol. Ecotoxicol*, 10, 325-333.
- Venegas Pérez, C., Zuñiga Lagunes, S.R., Rosas Pérez, I., Hernández Quiroz M.,Ponce de León Hill,C.,Cram Heidrich S. (2015). *Procedimientos para la evaluación del efecto tóxico de contaminantes*. 1era. Ed. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México. ISBN 968-607-02-6391-0.
- Wadleigh, M. A., Veizer, J., & Brooks, C. (1985). Strontium and its isotopes in Canadian rivers: Fluxes and global implications. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 49(8), 1727-1736.

- Walker C.H. (2008). Organics Pollutants an ecotoxicological perspective. Second edition. DOI: 10.1201/9781420062595.
- Wang, D., He, Y., Liang, J., Liu, P., & Zhuang, P. (2013). Distribution and source analysis of aluminum in rivers near Xi'an City, China. *Environmental monitoring and assessment*, 185(2), 1041-1053.
- Wiesner, J., Kříž, Z., Kuča, K., Jun, D., & Koča, J. (2007). Acetylcholinesterases—the structural similarities and differences. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 22(4), 417-424.
- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J., & Geffard, O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology*, 94(2), 114-122.
- Zhang, G., Chen, L., Chen, J., Ren, Z., Wang, Z., & Chon, T. S. (2012). Evidence for the Stepwise Behavioral Response Model (SBRM): The effects of Carbamate Pesticides on medaka (*Oryzias latipes*) in an online monitoring system. *Chemosphere*, 87(7), 734-741.
- Zhang, W., Liu, W., Zhang, J., Zhao, H., Zhang, Y., Quan, X., & Jin, Y. (2012). Characterisation of acute toxicity, genotoxicity and oxidative stress posed by textile effluent on zebrafish. *Journal of Environmental Sciences*, 24(11), 2019-2027.
- Zúñiga Lagunes, S., C. Robles Mendoza, JP. Hernández Pérez, LE. Piña Chacón, S. Alejandro Grimaldi, C. Vanegas Pérez. C. Ponce de León Hill, & S. Cram Heidrich (Eds.). (2015). *Procedimientos para la evaluación bioquímica del efecto tóxico de contaminantes* (1a. ed., pp. 9–30). México, D.F. Biblioteca Nacional de México..

ANEXOS

ANEXO I. ALBÚM FOTOGRAFICO

- Trabajo de Campo



Imagen 1. Descargas de la refinería Antonio al cauce del río Lerma en Salamanca, Gto.



Imagen 2. Descargas de la termoeléctrica de la Comisión Nacional de Electricidad en Salamanca, Gto.



Imagen 3. Sitio de muestreo (zona intermedia de la ciudad y posterior a vertederos industriales).



Imagen 4. Peces muertos observados durante el recorrido al río Lerma.



Imagen 5. Pez colectado durante el segundo muestreo.

- Trabajo de Laboratorio



Imagen 6. Sistema de registro utilizado para realizar los bioensayos de toxicidad.

ANEXO II. Determinación de proteínas por el método de Bradford

Fundamento

Es un método colorimétrico utilizado para la cuantificación de proteínas solubles totales (PST) en muestras biológicas. El método de Bradford, se basa en la unión del colorante Comassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante, en medio ácido, existe en dos formas: azul y naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para dar lugar a un complejo proteína-colorante. La determinación de la concentración de las proteínas se realiza mediante la preparación de una curva de calibración, empleando albúmina bovina (BSA) como proteína estándar que sirve de referencia debido a las concentraciones conocidas de la proteína.

Procedimiento

Preparación de la curva estándar

1. Diluir 1:10 el stock de 10mg/mL de BSA en agua bidestilada, concentración final 1mg/mL.
2. Diluir 1:5 la solución de 1mg/mL en agua bidestilada para obtener una solución con concentración final de 200 µg/mL.
3. De la solución de 200 µg/mL de BSA se toman diferentes volúmenes (**Tabla 6**) para realizar la curva estándar.

Tabla 6. Curva estándar de BSA.

Curva estándar de BSA	
(200µg/mL)	
0uL	Blanco
2uL	0.4 µl/mL
3uL	0.6 µl/mL
4uL	0.8 µl/mL
5uL	1.0 µl/mL
7.5uL	1.5 µl/mL
10uL	2.0 µl/mL
12.5uL	2.5 µl/mL

Determinación de concentración de PST de las muestras:

1. Para realizar este método se utiliza una placa de 96 pozos, fondo plano, estéril con tapa.
2. Se diluye el reactivo Bradford 1:5 en agua bidestilada (se prepara al momento de realizar la técnica y solo la cantidad requerida).
3. Se toman 2 μL del sobrenadante de las muestras y por duplicado, se añaden 200 μL del reactivo de Bradford diluido 1:5 en agua bidestilada, después la placa se deja en incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Después de los 5 minutos, se introduce la placa en un espectrofotómetro y se realiza la lectura a 595 nm.

ANEXO III: Determinación de la Peroxidación lipídica por la técnica de TBARS.

Procedimiento

1. Se prepara el baño María, se coloca un termómetro el cual se monitorea hasta que alcance una temperatura de 37 °C. Misma, que se debe mantener estable, mientras las muestras son descongeladas en hielo frappé y posteriormente son vortexeadas.
2. En una gradilla, se colocan 2 series de tubos de ensaye de 5 mL cada una. La primera serie corresponde a la serie basal y la segunda serie Fe²⁺.
3. Al blanco reactivo de la serie basal (B basal), se le agregan 1000 µL del buffer de Tris (150 mM, pH 7.4). Al blanco reactivo de la serie Fe²⁺ (B+), se le agregan únicamente 900 µL de buffer de Tris y 100 µL de FeSO₄ (500 µM) y al resto de los tubos de la serie basal, se les agregan 1000 µL de buffer de Tris y el volumen necesario (que previamente se calcula) para tener 1 mg de PST en cada grupo (controles y peces expuestos al río Lerma).
4. Posteriormente, se introducen las 2 series de tubos al baño María a 37°C, durante 30 min. Durante el tiempo de incubación, se prepara la solución de ácido tiobarbitúrico al 0.8%.
5. Pasado el tiempo de incubación, se sacan los tubos del baño María y a las 2 series se les agrega 1.5 mL de ácido acético (al 20%, pH 3.5), 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.8% y 500 µL de agua destilada.
6. Las muestras son calentadas en baño María a 92°C. Una vez que se alcanza dicha temperatura, las 2 series de tubos son introducidas, se tapan con canicas y se calentaron a ebullición durante 45 min. En la serie Fe²⁺ se aprecia un cambio de coloración.
7. Los tubos se ponen a enfriar a chorro de agua, posteriormente se les agrega 1 mL de KCl y se vortexean. Los volúmenes de las 2 series (basal y Fe²⁺) son tranferidos a tubos de ensaye de 20 mL.
8. De cada serie, se toma 1 mL de la fracción superior de cada tubo y se deposita en los tubos Eppendorf de 1.6 mL. Para después ser centrifugados a 7000 rpm durante 10 min.

9. Después de centrifugar, se toman 1-3 mL aproximadamente y son colocadas en la celda de cuarzo. Se lee la absorbancia a 532 nm, empezando por los blancos reactivos.

Se realizaron los cálculos utilizando la siguiente ecuación:

Cálculos

$$\frac{\text{absorbancia de la muestra}}{(0.0156)(\text{mg proteína})} = \frac{\text{nmoles de TBARS}}{\text{mg de proteína}}$$

Donde:

0.0156= coeficiente de extinción molar del aldehído malónico (MDA)

ANEXO IV. Evaluación de la actividad enzimática de la AChE

Procedimiento

1. Se inicia el programa del lector de microplaca trabajando el blanco reactivo y las muestras por triplicado. Se programa el equipo en modo de cinética enzimática (Kinetic protocol) a 25°C.
2. Se preparan las celdas del blanco reactivo colocando 25µL de buffer de fosfatos en los pozos de la microplaca por triplicado.
3. Se preparan las celdas de la muestra problema colocando 25 µL del sobrenadante centrifugado de cada una de las muestras de tejido homogeneizado por triplicado: grupo control y grupo experimental.
4. Se coloca la placa en el lector de microplaca y posteriormente se adiciona 150 µL de DTNB en todos los pozos con una micropipeta multicanal.
5. Se mezcla durante 5s y se lee a 405 nm. Se registra la absorbancia de la reacción endógena por mínimo 5 min (pre-incubación).
6. Después de la pre-incubación se abre el lector y se adiciona a todos los pozos 50 µL de la solución de acetilcolina con una micropipeta múltiple. Se cierra el lector, la microplaca se agita 5s y lee nuevamente a 405 nm. (tabla 6). Se registra la absorbancia de la reacción enzimática con intervalos de 30s a 25°C, por espacio de 15 min.

Soluciones	Blanco (µL)	Muestra (µL)
Muestra tejido homogeneizado	-----	25
DTNB 270 mM	150	150
Buffer fosfatos 50 mM	25	-----
Leer a 405 nm por 5 min a 25°C		
Acetilcolina 3 mM	50	50
Leer a 405 nm por 15 min a 25°C		

Tabla 7. Resumen del procedimiento para la evaluación de la AChE, en las muestras de homogenado de pez cebra, grupo control y experimental.

7. Se calcula la actividad enzimática por minuto por mg de PST (nmoles/min/mg PST), restando siempre el blanco reactivo a la absorbancia

de las muestras problema. Lo cual, es realizado automáticamente por el programa del lector de microplacas.

Cálculos:

La actividad enzimática se expresa como actividad específica de la AChE en nanomoles del producto formado por minuto por mg de PST (nmoles/min/mg PST), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$AE (AChE) = \frac{\Delta Abs / \text{min} \times 9 \times nmol}{0.0136 \times Pp \times mg PST} = nmoles / \text{min} / mg PST$$

Donde:

ΔAbs= cambio de la absorbancia por minuto. Si se realizan lecturas minuto a minuto corresponde a: (mOD/min final- mOD/min inicial). Tiempo, min. Si se emplea el protocolo de cinética enzimática del programa del lector, corresponde a la opción: Vmax,mOD/min.

0.0136= coeficiente de extinción molar (ε) para el ácido tio-nitrobenzoico (DTNB) a 405nm, el cual está expresado en L/(mol)(cm) y se simplifica como 0.0136 mL/nmolxcm.

Pp= profundidad del V_{total} trabajado en la celda de la microplaca (0.802 cm).

PST= concentración de las proteínas solubles totales de la muestra (mg PST/mL).