



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**ECOLOGÍA**

**EFFECTO CONJUNTO DEL CALENTAMIENTO GLOBAL Y LA CONTAMINACIÓN POR  
AGROQUÍMICOS SOBRE LA ESPECIE *Ambystoma mexicanum* ENDÉMICA DEL LAGO DE  
XOCHIMILCO**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**ERIC GÓMEZ MÉNDEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DIEGO DE JESÚS CHAPARRO HERRERA**  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. FAUSTO ROBERTO MÉNDEZ DE LA CRUZ**  
Instituto de Biología, UNAM

**DR. HIBRAIM ADÁN PÉREZ MENDOZA**  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, agosto de 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**ECOLOGÍA**

**EFFECTO CONJUNTO DEL CALENTAMIENTO GLOBAL Y LA CONTAMINACIÓN POR  
AGROQUÍMICOS SOBRE LA ESPECIE *Ambystoma mexicanum* ENDÉMICA DEL LAGO DE  
XOCHIMILCO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ERIC GÓMEZ MÉNDEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DIEGO DE JESÚS CHAPARRO HERRERA**  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. FAUSTO ROBERTO MÉNDEZ DE LA CRUZ**  
Instituto de Biología, UNAM

**DR. HIBRAIM ADÁN PÉREZ MENDOZA**  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, agosto de 2023**



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/424/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **16 de enero de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de (**Ecología**) del estudiante **GÓMEZ MÉNDEZ ERIC**, con número de cuenta **409067075** con la tesis titulada "**Efecto del calentamiento global y la contaminación por agroquímicos sobre la especie *Ambystoma mexicanum* endémica del Lago de Xochimilco.**", realizada bajo la dirección del **DR. DIEGO DE JESÚS CHAPARRO HERRERA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. SERGIO CHÁZARO OLVERA  
Vocal: DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA  
Vocal: DRA. ELIZABETH JOHANA DURÁN CAMPOS  
Vocal: DRA. SANDRA FABIOLA ARIAS BALDERAS  
Secretario: DR. HIBRAIM ADÁN PÉREZ MENDOZA

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 18 de mayo de 2023

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **Agradecimientos Institucionales.**

Le doy las gracias al posgrado en ciencias biológicas de la UNAM por la oportunidad de proseguir con mi formación académica en esta nueva etapa que es la Maestría en Ciencias Biológicas.

Igualmente agradezco al CONACYT por el apoyo económico, con clave: 2020-000026-02NACF-27112, que me permitió centrarme al 100% en culminar mi trabajo de tesis.

Por último le agradezco al Dr. Diego de Jesús Chaparro Herrera por todo el apoyo que me otorgó como mi tutor principal, de igual manera agradezco a el Dr. Fausto Roberto Méndez de la Cruz y al Dr. Hibraim Adán Pérez Mendoza como miembros del comité tutor quienes me apoyaron a pulir este documento con sus observaciones durante el desarrollo del proyecto.

## **Agradecimientos Personales.**

Agradezco a toda mi familia por todo el apoyo que me brindaron para realizar esta nueva meta en mi vida, a mi mamá por todo el tiempo que me ha ofrecido y consejos que me han ayudado toda mi vida, a mi papá por ser el apoyo que desde niño he tenido y por lo cual pude gozar de la oportunidad de dedicarme a mis estudios hasta el día de hoy y a mis hermanos por haber sido mis compañeros de juego cuando niño y una inspiración a seguir como adulto.

Le agradezco de todo corazón al doctor Diego de Jesús Chaparro Herrera, primeramente por aceptarme en el laboratorio y apoyarme a que este proyecto se consolidará y en segunda instancia por ser una inspiración para seguir adelante con mi siguiente meta que será el doctorado. Igualmente agradezco al Laboratorio de Bacteriología de la FES Iztacala por proveer de todo lo necesario para la fase de experimentación del proyecto.

También agradezco el apoyo que me dieron durante el desarrollo de mi proyecto los doctores Fausto Roberto Méndez de la Cruz e Hibrain Adán Pérez Mendoza, gracias a quienes pude pulir lo más posible el proyecto con sus observaciones en cada revisión. Así como a los sinodales y miembros del jurado de mi examen profesional que también me apoyaron con observaciones del escrito.

De igual manera les doy las gracias a todos mis profesores y compañeros con los que he vivido grandes cosas durante toda mi formación académica.

Por último te agradezco a ti lector, por interesarte en revisar el contenido de esta tesis, ya sea por interés propio o por la utilidad que tenga en tus proyectos propios.

## **Dedicatoria.**

Dedico este trabajo de tesis a toda mi familia, principalmente a mis padres quienes me apoyaron incondicionalmente durante todo este proceso, a mi mamá, gracias a quién he conseguido alcanzar esta nueva meta, a mi papá, quien ha seguido siendo un gran apoyo para mi familia y a mis hermanos por inspirarme a seguir adelante con mi formación académica. Es gracias a todos ellos que he logrado centrarme en continuar mis estudios después de varios años de haberme separado de mi formación académica.

De igual manera al doctor Diego de Jesús Chaparro Herrera, quién me apoyó con todo lo necesario durante el proceso de experimentación y de escritura de este documento, así como por ser una gran inspiración para continuar con mis estudios y ser una persona realmente dedicada con sus estudiantes.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Bacteriología con quienes de vez en cuando pude tener una buena charla y que en ocasiones me preguntaban sobre el posgrado, esperando que todos ellos puedan en su momento experimentar lo que es esta fase. Así como a mis compañeros de la licenciatura, principalmente a los que estuvieron en mi querido grupo 51 y a los que les deseo lo mejor en lo que sea que se dediquen hoy en día.

A todos mis profesores de la licenciatura y la maestría, ya que en parte es gracias a ellos que a día de hoy me encuentro presentando este trabajo y a los profesores del Laboratorio de Herpetología, lugar donde pasé algunos de los mejores momentos de mi licenciatura y donde aprendí a manejar y cuidar tantos animales increíbles.

Por último a todos los científicos y académicos de la UNAM, más allá de ello, lo dedico a toda persona que sin importar su procedencia se ocupe en mejorar el hermoso país donde vivimos a través de sus estudios e investigaciones.

## Índice.

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES.....	10
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVOS.....	13
JUSTIFICACIÓN.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	21
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

## Resumen.

El calentamiento global implica un aumento en la temperatura debido a los gases de efecto invernadero que retienen la energía proveniente de la radiación solar, entre los principales gases de efecto invernadero están el metano, el óxido nítrico y el CO<sub>2</sub>. Los cambios generados por este calentamiento pueden generar afecciones y mortalidad en comunidades ecológicas, siendo el grupo de anfibios uno de los más afectados. Este grupo se clasifica en tres órdenes: Anura, Gymnophiona y Caudata, este último de distribución holártica. Dentro de los géneros de caudados destaca el género *Ambystoma*, en el que se encuentra una de las especies con mayor importancia, *A. mexicanum*, la cual es de gran importancia científica debido a sus características fisiológicas y morfológicas. Sin embargo está catalogada como especie en peligro de extinción crítico en la lista roja de la IUCN debido a su hábitat severamente fragmentado. Se ha identificado que una de las actividades que lo afectan es la utilización de agroquímicos, que junto con otras problemáticas cambian la calidad del agua donde habita la especie. Dentro de los agroquímicos existen cerca de 1,600 productos a nivel mundial, registrándose en México cerca de 143 compuestos, de los cuales 28 no se recomiendan desde 1989, en la actualidad existen únicamente 150 compuestos permitidos para uso agrícola.

Entre los anfibios estos compuestos se caracterizan por provocar una alta mortandad, anormalidades morfológicas, poco éxito en la eclosión, pequeño tamaño tras la metamorfosis, problemas en procesos fisiológicos, afecciones en la movilidad, en la acción inmunológica y en el comportamiento. Se desconoce la gravedad de las afecciones que los agroquímicos en conjunto con el aumento de la temperatura y la incidencia de la radiación UV-B causados por el calentamiento global y que daños puedan generar sobre la especie, razón por la que se busca determinar si existe una sinérgia entre estos. Pese a que se han llevado a cabo estudios sobre las afecciones debidas al aumento de la temperatura y la radiación UV-B, así como las derivadas del uso de agroquímicos, se desconoce cómo es su acción sinérgica sobre las especies de anfibios, como la del ajolote mexicano el cual carece de medios para dispersarse fuera de su hábitat, quedando sometida a estas problemáticas. Por lo que se buscó determinar las afecciones que los agroquímicos en suma con el aumento de temperatura y la incidencia de radiación UV-B en el hábitat, originados por el calentamiento global tienen sobre la especie *A. mexicanum*, así como evaluar los efectos en el desarrollo, la eclosión, el crecimiento, la sobrevivencia y las malformaciones.

Para ello se realizó un experimento ex situ sobre organismos en estado de embrión y después de su eclosión en las primeras etapas larvares, evaluando tres temperaturas de 15, 21 y 25 °C con 4 concentraciones del agroquímico Clorpirifos Etil (CPF) marca Clover 480 CE al 44.50% en peso de 0, 0.025, 0.05 y 0.10 µl CPF / L y 4 incidencias de radiación UV-B con lámparas de luz UV-B modelo F8T5/BLB de 0%, 30% que representa una incidencia de 7.1 µmol de fotones, 65% con 13.8 µmol de fotones y 100% con 18.4 µmol de fotones. Observándose una correlación entre las variables de estudio, evidenciando severas afecciones en los organismos expuestos a las mayores incidencias de temperatura, la radiación UV-B y el agroquímico, estimando una disminución en la sobrevivencia de los organismos expuestos en comparación a los organismos presentes en el grupo control. Respecto a las tallas obtenidas por los organismos se observaron diferencias no tan marcadas obteniéndose valores promedio similares al final de las exposiciones, por último aunque no se observaron diferencias muy marcadas en los tiempos de eclosión entre los grupos expuestos y el grupo control, la inviabilidad de los organismos aumentó con respecto al aumento de la incidencia y concentración de los factores.

## **Abstract.**

The Global Warming implies an increase in the temperature due to the greenhouse effect gasses which retain the energy from the solar radiation, between the principal greenhouse effect gasses are methane, nitric oxide and CO<sub>2</sub>. The changes generated because of this warming can generate affections and mortality in ecological communities, being the group of amphibians one of the most affected. This group is classified in three orders: Anura, Gymnophiona and Caudata, this last one of holarctic distribution. Between the caudata genus the *Ambystoma* genus stands out and in it one of the most important species is *A. mexicanum*, a species of great scientific importance due to its physiological and morphological characteristics. Nevertheless it is cataloged as a species in critical extinction danger in the IUCN red list due to its severely fragmented habitat. Been one of the activities that affect it the use of agrochemicals, that besides other problems change the water quality where the species inhabits. Within agrochemicals there are about 1,600 products worldwide, registering close to 143 compounds in México, of which 28 are not recommended since 1989, nowadays there are only 150 compounds permitted for agricultural use.

Been characterized in amphibians for a high mortality, morphological abnormalities, little hatching success, small size on the metamorphosis, problems in physiological processes, affection in mobility, in the immunological action and in the behavior, and ignoring the gravity that the affections that agrochemicals joint with the temperature increase and the UV-B radiation incidence caused by the global warming can generate on the specie, reason why it has been searching if there exist a synergy between them. Although there are studies about affections because of the temperature and the UV-B radiation, as well as the derived from the agrochemicals it is unknown how is their synergistic action on the amphibian species, as the mexican axolotl which lack the means to disperse outside of its habitat been forced to interact with this troubles. Because of that, it was sought to determine the affections that agrochemicals together with the temperature and the UV-B radiation in the habitat caused by global warming have on the species *A. mexicanum* assessing effects on the development, the hatching, the growth, surviving and malformation.

For that an ex situ experiment was realized on organisms in embryonic and the first larvarian stages after the hatching, assessing three temperatures of 15, 21 and 25 °C with four concentrations of the agrochemical Clorpirifos Etil Clover 480 CE trademark at 44.50% in weight of 0, 0.025, 0.05 and 0.10 µl CPF / L and four UV-B radiation incidences with UV-B light lamps model F8T5/BLB of 0%, 30% representing an incidence of 7.1 µmol of photons, 65% with 13.8 µmol of photons and 100% with 18.4 µmol of photons. Observing a correlation between the studied variables, evidencing higher affections on the organisms exposed to the higher incidences of temperature, the UV-B radiation and the agrochemical, estimating a decrease in the survival of the organisms exposed in comparison with the organisms in the control group, about the sizes obtained by the organisms it was not observed mark differences obtaining similar average values at the end of the observations, lastly even to there were not observed very marked differences in the hatching times between the control and the exposed groups, the inviability of the organisms increased regarding the increase of the incidence and concentration of the factors.

## **Introducción.**

El calentamiento global es el incremento en la temperatura del planeta debido al efecto invernadero, causando rápidos cambios en los patrones climáticos. Este efecto invernadero se da cuando algunos gases en la atmósfera retienen energía proveniente de la radiación solar generando así un incremento en la temperatura terrestre. Algunos de estos gases de efecto invernadero son el metano, el óxido nítrico y el CO<sub>2</sub> contribuyendo este último con el 56% al calentamiento global (Sivaramanan, 2015), dándose emisiones de CO<sub>2</sub> anuales que alcanzan los 49.5 billones de toneladas (Dutta, 2018).

Debido a los cambios generados por el calentamiento global, las especies que no logren adaptarse serán susceptibles a una mayor tasa de mortalidad y efectos subletales significativos, así como afecciones a comunidades ecológicas enteras. Reconociéndose estos daños a numerosas especies, el grupo de los anfibios es uno de los más afectados, ya que se ha evidenciado que cambios bruscos en el clima podrían generar una disminución en sus poblaciones (Bancroft et al., 2010).

De hecho cerca del 52% de anfibios están sujetos a requerimientos especiales de hábitat, una limitada habilidad para dispersarse y larvas dependientes del agua, haciendo que los cambios en parámetros ambientales como son la temperatura, la radiación solar, la humedad, la cobertura de nubes y la precipitación tengan grandes implicaciones en la biodiversidad (Dutta, 2018).

Entre los efectos perjudiciales en el grupo de anfibios están las afecciones en los tiempos de cría, como sucede debido al incremento de la temperatura estacional, de igual manera se han visto afectadas las estructuras de las comunidades de algunas especies, incrementándose los ritmos de depreciación de estas (Blaunstein et al., 2002), también se han visto alteraciones en los periodos de hibernación y en la habilidad para encontrar comida e inclusive podría influenciar en su comportamiento, incluido el reproductivo (Bancroft et al., 2010).

De igual manera se ha encontrado que el incremento de la temperatura tiene un efecto negativo en el número de puesta, se da una menor eclosión y las larvas generadas son más pequeñas, algunas de las cuales desarrollan deformidades, probablemente debidas a su rápido desarrollo en condiciones de mayor temperatura (Denöel y Galloy, 2010); debido en parte a que al aumentar la temperatura se disminuye el nivel de oxígeno disuelto que obstaculiza el desarrollo embrionario y puede acelerar o suprimir la eclosión (Dutta, 2018). Igualmente se da una reducción en la sobrevivencia de las larvas por impactos térmicos crónicos y agudos cuando la temperatura del agua rebasa el límite térmico del organismo, reduciendo con ello el número de juveniles y por tanto afectando el tamaño poblacional (Andrea et al., 2012).

El cambio climático se conjunta con otros factores que pueden acelerar la disminución poblacional de los anfibios como es el caso de la radiación UV-B y de ciertos contaminantes (Dutta, 2018), siendo los más importantes los utilizados en la industria agropecuaria.

La contaminación por agroquímicos se ve caracterizada en los anfibios por una alta mortandad, anomalías morfológicas, poco éxito en la eclosión, pequeño tamaño en la metamorfosis y problemas en procesos fisiológicos como la atenuación en funciones del hígado y del riñón. Igualmente se han observado afecciones a la movilidad, en la acción inmunológica y en el comportamiento. (Ding et al., 2014). De igual manera existen impactos indirectos en el crecimiento debido a interrupciones en la red alimentaria, así como por la acción de herbicidas que reducen la producción primaria y que por lo tanto generan una mayor competencia (Bancroft et al., 2013).

En ciertos estadios tempranos estas afecciones causan desbalances energéticos ya que los organismos requieren más energía en desintoxicarse o en procesos metabólicos alterados que afectan la homeostasis energética, e incluso llega a observarse la disminución en compuestos bioquímicos que se atribuyen a mecanismos de compensación metabólica (Langlois et al., 2020), sin que esto signifique que tales afecciones no puedan estar presentes en los organismos adultos.

Se ha intentado demostrar cómo actúan los agroquímicos en los anfibios, encontrándose evidencia de que podrían inclusive causar disrupciones endocrinas, alterando con ello procesos fisiológicos y pudiendo llegar a alterar la expresión génica al actuar el nitrato con hormonas tiroideas y generar óxido nítrico reactivo que afecta desde proteínas esenciales hasta el RNA mensajero e incluso la propia transcripción (Langlois et al., 2020). Agravándose la problemática ya que existe una correspondencia de la aplicación de estos químicos durante el crecimiento de los estadios sensitivos embrionarios y larvarios, ya que ambos eventos suelen ocurrir a inicios de la primavera (Bancroft et al., 2013).

Xochimilco es una zona agrícola que ocupa una superficie de aproximadamente de 6272 ha, de las cuales cerca de 4308 ha se destinan al cultivo de maíz, mientras que 982 ha es la superficie cultivada en chinampas (Sivaramanan, 2015), así mismo se ha convertido en un gran centro turístico ya que posee una gran importancia ecológica, lo que deriva en un enorme potencial como reserva biológica (Stephan-Otto, 1996). A pesar de esto la zona presenta severas afecciones que directa e indirectamente dañan las diferentes especies que allí habitan. Desde principios de 1900 al construirse el sistema Xochimilco-Chapultepec para abastecer de agua potable a la Ciudad de México, los canales y la calidad del agua han padecido diferentes tipos de deterioro como resultado del secado de los canales de las chinampas en los años 50s y su reabastecimiento durante 1987 con agua tratada, en años posteriores la calidad del agua ha sufrido mayor deterioro debido a efluentes domésticos, desechos de ganadería y uso de agroquímicos (Ortega, 1992).

De estos últimos existen aproximadamente 1600 productos a nivel mundial, registrándose en México 143 compuestos en 1989, de los cuales 28 no son recomendados por la ONU y podrían formar parte de la lista de tóxicos prioritarios de organismos como la Environmental Protection Agency o la OMS. En 1994 se estableció una lista de 342 compuestos permitidos. Sin embargo en la actualidad la Dirección General de Sanidad Vegetal tiene autorizados únicamente 150 compuestos para uso agrícola (Jiménez, 2001).

En la zona de Xochimilco los agroquímicos de mayor utilización son los plaguicidas, principalmente el diazinón, dicofol, lindano, pentaclorofenol, malatión, fentiión y estiión; perteneciendo estos al grupo de los organofosforados, aún estando algunos prohibidos o con uso restringido en otros países (Bojorquéz y Esquivel, 2017). Por otro lado Cram et al. 2009 reportaron análogamente un control de plagas en Xochimilco donde se utilizaba principalmente pesticidas organofosforados, siendo clorpirifos (CPF) y malatión de los más aplicados, sin embargo no se reportaron las tasas de aplicación debido a que son desconocidas. Con base en lo anterior ha quedado demostrada la aplicación de pesticidas de forma intensiva y continua en la zona, lo que podría dar lugar a la presencia de concentraciones posiblemente letales.

Cabe destacar que el uso de pesticidas organofosforados es preferible al de los organoclorados, ya que estos últimos poseen una vida media mayor, por lo que permanecen más tiempo en el ambiente (Bishop et al., 2002), teniendo en cuenta esta información, se desconoce si también existe aplicación de pesticidas organoclorados en Xochimilco.

Dentro del grupo de los vertebrados, los anfibios se encuentran clasificados en tres órdenes, Anura compuesto por poco más de 6000 especies, Gymnophiona con cerca de 200 especies y Caudata con 650 especies aproximadamente. Este último grupo se distribuye mayormente en la región Holártica, suelen ser de cuerpos alargados, presentando dos pares de patas y una cola larga. Pudiendo presentar dos formas de vida, terrestre o acuática. Dentro de los géneros acuáticos de caudados, destaca el género *Ambystoma* el cual habita en ríos, lagos y charcas (Flores-Villeda, 2014 b). Una de las especies con mayor importancia dentro de este es *Ambystoma mexicanum*, una de las características más interesantes de la especie es que presenta neotenia, es decir alcanza la madurez sexual sin cambiar de su morfología larvaria (Stephan-Otto, 2003). Por lo tanto *A. mexicanum* posee gran importancia a nivel de investigación sirviendo como modelo de procesos fisiológicos y morfológicos del grupo, así como en procesos hormonales buscando explicar el proceso regenerativo que posee (Stephan-Otto, 1996).

Sin embargo, casi 41% de especies de anfibios está clasificado como amenazadas (Andrea et al., 2012) sin ser *A. mexicanum* una excepción ya que se encuentra catalogada como especie en peligro de extinción crítico dentro de la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés), debido a que su área de ocupación es menor a 10 km<sup>2</sup>, con un hábitat severamente fragmentado estimado al 11 de Noviembre de 2008 (Flores-Villeda, 2014 a).

De hecho son tan fuertes las presiones que sufre la especie que se desconoce la distribución actual de los organismos, identificando (Contreras et al., 2009) solamente once áreas potenciales de ocurrencia y reportando una abundancia de 100 individuos/km<sup>2</sup>.

## **Antecedentes.**

Para asociar la problemática causada por la conjunción de los efectos del calentamiento global y la contaminación por agroquímicos disueltos en el lago de Xochimilco se realizó una búsqueda de trabajos relacionados a la problemática del ascenso en la temperatura debido al calentamiento global y de los efectos de los agroquímicos sobre *A. mexicanum*.

La preocupación sobre las poblaciones de anfibios debido a la mayores temperaturas ha llevado a los diferentes investigadores y miembros académicos a considerar con acercamiento científico la problemática, tal es el caso de Bancroft et al., 2010, quienes de manera general expusieron las afecciones que el aumento de la temperatura tiene sobre las especies de anfibios, desde los cambios en los rangos geográficos, una menor sobrevivencia debido a afecciones de procesos fisiológicos, así como efectos en el desarrollo, siendo más breve conforme aumenta la temperatura y generando individuos más pequeños, también queda evidenciado cambios en comportamiento de forrajeo y dispersamiento, e inclusive efectos indirectos como es el cambio del hábitat, la disponibilidad de alimento y cambios en las comunidades.

Por otra parte Belden y Blaunstein. (2003), demostraron los efectos de la radiación UV-B sobre varias especies de anfibios, comparando el éxito de eclosión en puestas afectadas con la radiación ultravioleta y en aquellas protegidas de la misma, observándose un menor éxito en aquellas que recibieron la radiación UV-B, así como cambios de comportamiento, de crecimiento y de desarrollo. Por otro lado mencionan que los mecanismos de defensa de los anfibios, van desde limitar la exposición a la radiación, la pigmentación, proteínas de choque en los huevos, e inclusive mecanismos de reparación de ADN, todo esto sin tener presente otra problemática como sería el caso de la presencia de agroquímicos.

Debido a que de la zona chinampera y agrícola de Xochimilco los productos empleados se extienden hasta el agua de los canales y por tanto al lago, hay un gran interés de reconocer los efectos de tales químicos en la población de *A. mexicanum*, que ha llevado a realizar estudios como el de Cram et al. (2009), quienes correlacionaron los efectos de diferentes concentraciones de clorpirifos (0.75, 1, 1.5, 2 y 2.5 mg/L) y malatión (10, 15, 20, 25 y 30 mg/L), sobre la etapa embrionaria y dos etapas larvianas de la especie, registrando concentraciones letales media (LC50) y mortalidad para las etapas embrionaria y ambas etapas larvianas, así como daños en la actividad motora, malformaciones, convulsiones y espasmos en las etapas larvianas, observándose una correspondencia mayor conforme aumentó la concentración de los químicos.

Dentro de las problemáticas relacionadas con la contaminación por agroquímicos está el movimiento de *A. mexicanum*. Hernández et al., (2010), encontraron que la exposición a clorpirifos está relacionado con la actividad de las esterasas, de gran importancia en la actividad motora, utilizando dos concentraciones del pesticida (0.05 y 0.1 mg/L) y registrando el comportamiento y la actividad motora, así como un análisis de esterasas, encontrando una disminución de ellas y de la actividad motora conforme aumentaba la concentración de clorpirifos.

Es tal el interés de reconocer los efectos de los agroquímicos sobre la especie, que se han llevado a cabo trabajos para mejorar la metodología en la determinación de plaguicidas sobre *A. mexicanum*, tal es el caso de Hernández et al., 2013, que buscaron comprobar una metodología para determinar la concentración de plaguicidas organofosforados en los tejidos de juveniles de la especie, para ello los expusieron a tratamientos con concentraciones de clorpirifos similares a las de campo 0.05 y 0.1 mg/L, obteniendo recuperaciones por encima del 90% para los plaguicidas estudiados por el método de extracción asistida por microondas y su cuantificación por cromatografía de gases.

Por otra parte se han llevado a cabo trabajos para evaluar la sinergia del calentamiento global y los agroquímicos con otros organismos, tal como lo descrito por Ecimovic y Velki. (2015), quienes observaron que un aumento en la temperatura iba ligado a una mayor toxicidad de los agroquímicos, comprobándolo en plaguicidas como clorpirifos y carbamatos, al evaluar LC10, LC50 y LC90 en lombrices del género *Eisenia fetida*.

## **Hipótesis.**

Si el calentamiento global que genera un aumento de la temperatura a través de la incidencia de la radiación ultravioleta en el ambiente y se presenta una contaminación por agroquímicos organofosforados en la zona agrícola de Xochimilco, los cuales ocasionan inhibición de la acetilcolinesterasa, una enzima encargada de la sinapsis nerviosa, al unirse a su sitio activo, evitando la actividad de hidrólisis de la acetilcolina, generando un exceso de este neurotransmisor, ocasionando estimulaciones más prolongadas de lo normal (Cruz, 2009 y Badii y Varela, 2008), la acción tóxica también genera una mortandad elevada, un crecimiento reducido y anormalidades en el desarrollo (Bancroft et al., 2013). Entonces por la acción toxica de estos plaguicidas y su relación sinérgica con los factores ambientales se generará una modificación en las tasas de desarrollo embrionario, un crecimiento reducido anormalidades en el desarrollo y una mortandad elevada de *A. mexicanum*.

### **Objetivo General.**

Determinar los efectos del calentamiento global en sinergia con la contaminación por agroquímicos, sobre la población de *Ambystoma mexicanum* en el lago de Xochimilco.

### **Objetivos Particulares.**

- | Determinar mediante ensayos la relación entre los agroquímicos disueltos en el lago de Xochimilco y el efecto del calentamiento global debido al incremento en la temperatura y la radiación UV sobre la especie *A. mexicanum*.
- | Evaluar el impacto sinérgico entre los agroquímicos presentes en el agua del lago de Xochimilco con los efectos del calentamiento global sobre la eclosión y desarrollo embrionario de *A. mexicanum*
- | Analizar si se presentan cambios en el crecimiento somático de *A. mexicanum* con respecto al efecto conjunto de los agroquímicos presentes en el lago de Xochimilco, el aumento de la temperatura y la incidencia de radiación UV.
- | Registrar la sobrevivencia y observar las malformaciones causadas por el efecto conjunto de la temperatura y la radiación UV respecto a diferentes concentraciones de agroquímicos.
- | Estimar los efectos en la actividad motora de *A. mexicanum* respecto a la relación de las condiciones de temperatura, radiación UV y concentración de agroquímicos en el medio.

## **Justificación.**

Se han llevado a cabo numerosos trabajos en diferentes tipos de anfibios con respecto a las afecciones metabólicas (observadas en la atenuación de funciones en hígado y riñón), morfológicas (como deformidades, parálisis o problemas físicos) (Ding et al., 2014) y energéticas (debido a un requerimiento energético en la desintoxicación y alteraciones en la homeostasis energética) (Langlois et al., 2020). Por otra parte y aún cuando se conocen los patrones con los que se lleva a cabo el calentamiento global, debido al efecto invernadero y las afecciones que numerosos químicos realizan en la biología de los anfibios, cada factor se ha analizado de manera aislada, por lo que resulta importante revisar los efectos sinérgicos del calentamiento global con la contaminación por agroquímicos sobre la población de *A. mexicanum* en el lago de Xochimilco.

Debido a las características neoténicas de la especie que dificultan su dispersamiento y la obligan a pasar su periodo de vida dentro del agua, queda patente que la especie se ve forzada a adaptarse al incremento de temperatura del medio acuático donde habita, así como a una menor calidad del agua debido a diferentes contaminantes, como aquellos que provienen de los afluentes domésticos y a los de retorno agrícola que contienen agroquímicos, que se presentan constantemente debido a que Xochimilco cuenta con una amplia zona agrícola.

Ecimovic y Velki en 2015 observaron un mayor efecto tóxico de los agroquímicos con el aumento de la temperatura, como lo observado y reportado en *E. fetida*. Es de suma importancia conocer los efectos letales y subletales que la sinergia lleva a cabo en *A. mexicanum* ya que posee una gran importancia como especie de investigación debido a sus cualidades, puede ser útil como indicador biológico y posee gran importancia cultural.

Por tales razones se busca evaluar los efectos conjuntos de la temperatura, la radiación UV y los agroquímicos disueltos en el agua del lago de Xochimilco sobre el desarrollo embrionario, su eclosión, así como los efectos adversos en el crecimiento, en la sobrevivencia y en su morfología a causa de los mismos en la especie.

## **Materiales y métodos.**

### Experimento de temperatura, incidencia de radiación ultravioleta y diferentes concentraciones de agroquímicos.

Se obtuvieron aproximadamente 1,000 huevos fertilizados de *A. mexicanum* de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala a partir de cuatro eventos reproductivos diferentes, utilizando como cohorte cada conjunto de huevos del mismo evento reproductivo para un único experimento a diferente temperatura, empleando un total de 960 huevos. Los organismos fueron separados colocando cinco organismos en encierros de vidrio para cada tratamiento, realizándose tres repeticiones por tratamiento, por lo que se observó un total de 15 individuos por cada tratamiento, excluyendo el grupo control donde las condiciones fueron iguales para todos los organismos. Se excluyeron aquellos huevos percibidos como inviábiles.

Si bien se mantuvieron las condiciones de Oxígeno disuelto y pH, la condición de la temperatura varió, suministrándose en un periodo de cinco horas al día y aplicándose un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Se obtuvo el agroquímico Clorpirifos Etil de la marca Clover 480 CE al 44.50% en peso y se emplearon cuatro niveles de tratamiento tomando en consideración las concentraciones de clorpirifos en el agua de los canales reportados por Mercado et al. (2015), constando de un tratamiento sin agroquímicos disueltos, 0.025, 0.05 y 0.10 µl de CPF/L.

Para evitar generar daños innecesarios a los organismos, se obvió el realizar un antexperimento con las LC0 y LC100, que permitiría obtener valores de aplicación entre estos, centrándose en los niveles de tratamiento propuestos con base en las concentraciones reportadas por Mercado et al. (2015).

Para la variación de la temperatura en los experimentos se utilizaron termostatos, los cuales fueron colocados junto a los recipientes de vidrio que contenían a los organismos en una pecera de mayor amplitud, llenándola de agua a un 30% para que esta actuara como difusor de la temperatura, con este procedimiento se obtuvieron variaciones máximas de aproximadamente  $\pm 1.5$  °C, para el caso de la temperatura más baja en ciertas ocasiones se utilizaron bolsas refrigerantes de gel hasta alcanzar la temperatura deseada. Se establecieron los valores objetivo de temperatura entre 15 y 25 °C, considerando que la temperatura media anual del agua de Xochimilco oscila entre los 12 y los 18 °C, con una temperatura máxima de 20°C (López et al., 2015). Por otra parte, se ha estimado que existe un aumento de la temperatura de 0.4 °C, por arriba de las temperaturas promedio de los cinco siglos anteriores (PAGES 2k Network, 2013), por lo que se utilizaron rangos mayores de temperatura lo que ayudará a comprender las afectaciones que podría sufrir *A. mexicanum* en un tiempo futuro, ya que se espera que la temperatura siga en aumento.

Para ello se emplearon tres niveles de temperatura, siendo estas 15, 21 y 25 °C, que se mantuvieron por un máximo de 5 horas al día para evitar afecciones crónicas en los organismos. Respecto a la radiación ultravioleta se aplicó el método de Chaparro et al. (2018), empleando 4 niveles de intensidad de radiación UV-B de 0, 30, 65 y 100% utilizando lámparas de luz UV-B modelo F8T5/BLB que emiten luz ultravioleta en una longitud de onda de 350 – 365 nm y tapas elaboradas con malla que permiten un paso de 13.8  $\mu\text{mol}$  de fotones para la malla de 35%, con la que se generó la intensidad de radiación UV-B de 65%, 7.1  $\mu\text{mol}$  de fotones para la malla de 70 %, con la que se obtuvo la intensidad de 30%, 18.4  $\mu\text{mol}$  de fotones sin ningún tipo de barrera y nulo paso de fotones utilizando una tapa de papel metálico que evitó el paso de la radiación UV-B hasta los organismos; para el caso de la intensidad de 0% de radiación UV-B (los valores de radiación UV-B fueron obtenidos utilizando un medidor de radiación UV marca Apogee instruments modelo MU-200), para evitar que la radiación incidiera por los costados de los recipientes e incidiera únicamente por la parte superior se forraron los costados de todos los recipientes con papel metálico, de igual manera las paredes de la pecera que contenía a estos últimos se forraron para evitar salida de la radiación UV-B y se utilizó una tapa con las lámparas de radiación UV-B ancladas en la parte superior y todas las paredes forradas de papel metálico para que no hubiera exposición fuera del encierro, aplicando la incidencia de radiación UV-B durante un periodo de 12 horas al día y permitiendo un reposo durante las horas de noche, simulando el fotoperiodo natural.

Efecto sinérgico de temperatura, radiación UV-B y agroquímicos.

Para evaluar el efecto sinérgico entre la temperatura, la radiación UV-B y los agroquímicos disueltos se utilizaron los niveles antes mencionados para cada una de las variables, teniendo un conjunto de 48 combinaciones totales, corroborando si un incremento de todas las variables genera mayores afecciones. Asimismo se dispuso de un control que no fue sometido a ninguna de las variables de estudio, con el cual se realizaron las comparaciones correspondientes.

Temperatura (°C)	Concentración de Clorpirifos etil (µl CPF/L)	Radiación UV-B (%)
15	0	0
	0.025	30
	0.05	65
	0.10	100

Temperatura (°C)	Concentración de Clorpirifos etil (µl CPF/L)	Radiación UV-B (%)
21	0	0
	0.025	30
	0.05	65
	0.10	100

Temperatura (°C)	Concentración de Clorpirifos etil (µl CPF/L)	Radiación UV-B (%)
25	0	0
	0.025	30
	0.05	65
	0.10	100

Tabla 1. Niveles de tratamiento de temperatura, concentración de clorpirifos etil y radiación UV que fueron empleados.

### Variables de respuesta.

Se registró el desarrollo embrionario, la eclosión, y la sobrevivencia, considerándose como inviable todo huevo que genere un color blanquecino opaco. Posterior a la eclosión se registraron los efectos en el crecimiento somático, malformaciones y efectos adversos en la movilidad en los juveniles tempranos, así como la sobrevivencia, para estimarla se procedió a tocar levemente la cola de los individuos sin lastimarlos, todos aquellos organismos que no reaccionaran al estímulo fueron trasladados a un microscopio estereoscópico para su observación, esto debido a que el agroquímico incide directamente en la movilidad, por lo que algunos organismos vivos no presentan reacción, considerándose muertos a aquellos donde no se percibiera el movimiento del corazón al ser volteados sobre su parte dorsal, por otra parte la oxigenación en las branquias puede ser apreciada en microscopio, esto debido a que los organismos en esta etapa son semitranslúcidos. Los huevos inviables, así como los organismos que fallecieron fueron retirados del medio.

Se llevó a cabo un registro fotográfico durante el desarrollo experimental, las imágenes obtenidas fueron utilizadas para realizar mediciones utilizando el software especializado ImageJ, así como para realizar comparaciones entre los tratamientos y el grupo control.

- Efecto en el desarrollo embrionario.

Se analizaron cada uno de los embriones en los diferentes niveles de tratamiento, estos fueron comparados con aquellos que se encuentran en el tratamiento control, cualquier diferencia observada durante el desarrollo fue registrada fotográficamente y se realizó un seguimiento del desarrollo embrionario, siendo esto factible ya que el recubrimiento del embrión es completamente transparente.

- Efecto en el tiempo de eclosión.

Se examinaron las diferencias en el tiempo de eclosión de los organismos dentro de los diferentes tratamientos con respecto a aquellos que se encuentran en el tratamiento control. Utilizándose la misma cohorte, en el mismo estadio de desarrollo, en todos los tratamientos para evitar sesgos en los tiempos de eclosión.

- Efecto sobre la sobrevivencia.

Durante la etapa de desarrollo embrionario, así como en la etapa de juvenil temprano, se examinaron diariamente los organismos inviábiles y/o inmóviles para el caso de juveniles, comparándose con respecto a los organismos del grupo control, para determinar qué porcentaje de la inviabilidad es causada por efecto de los tratamientos y que porcentaje es natural.

Se calculó una tabla de sobrevivencia ( $lx$ ) como lo describen Chaparro et al. (2018), utilizando los valores del número de sobrevivientes diarios iniciales con respecto al número de sobrevivientes al tiempo siguiente, siendo evidente la relación del número de embriones y larvas inviábiles, expresándose como la diferencia:

$$dx = lx - lx+1$$

- Registro de malformaciones.

Para ambas etapas de desarrollo se llevó a cabo un registro fotográfico de las malformaciones morfológicas observadas con el fin de reconocer las afecciones morfológicas causadas por los diferentes tratamientos. De igual manera se comparó con el grupo control para confirmar que tales afecciones son causadas principalmente por los diferentes tratamientos evidenciando que el porcentaje de malformaciones causadas de manera natural son menores.

- Tamaño.

Se registró el tamaño de los juveniles utilizando el software de medición ImageJ y se compararon los resultados de los diferentes tratamientos con respecto al control, con el fin de corroborar si existe una relación entre los niveles de tratamiento y las afecciones respecto al tamaño del organismo.

- Coloración.

Se empleó de igual manera el software ImageJ ya que permite medir la coloración en las imágenes del registro fotográfico para comparar diferencias asociadas con las afecciones de los diferentes tratamientos, de manera análoga fueron comparados con los organismos del tratamiento control.

#### Estadísticos.

Con el objetivo de evaluar si existen diferencias significativas entre los tratamientos y debido a las tres variables analizadas se realizó un ANOVA de tres vías, posterior a la realización de la ANOVA de tres vías se procedió a realizar la prueba de Tukey para reconocer la sinergia entre las variables, ya que esta trabaja comparando las medias de los factores de dos en dos.

## **Resultados.**

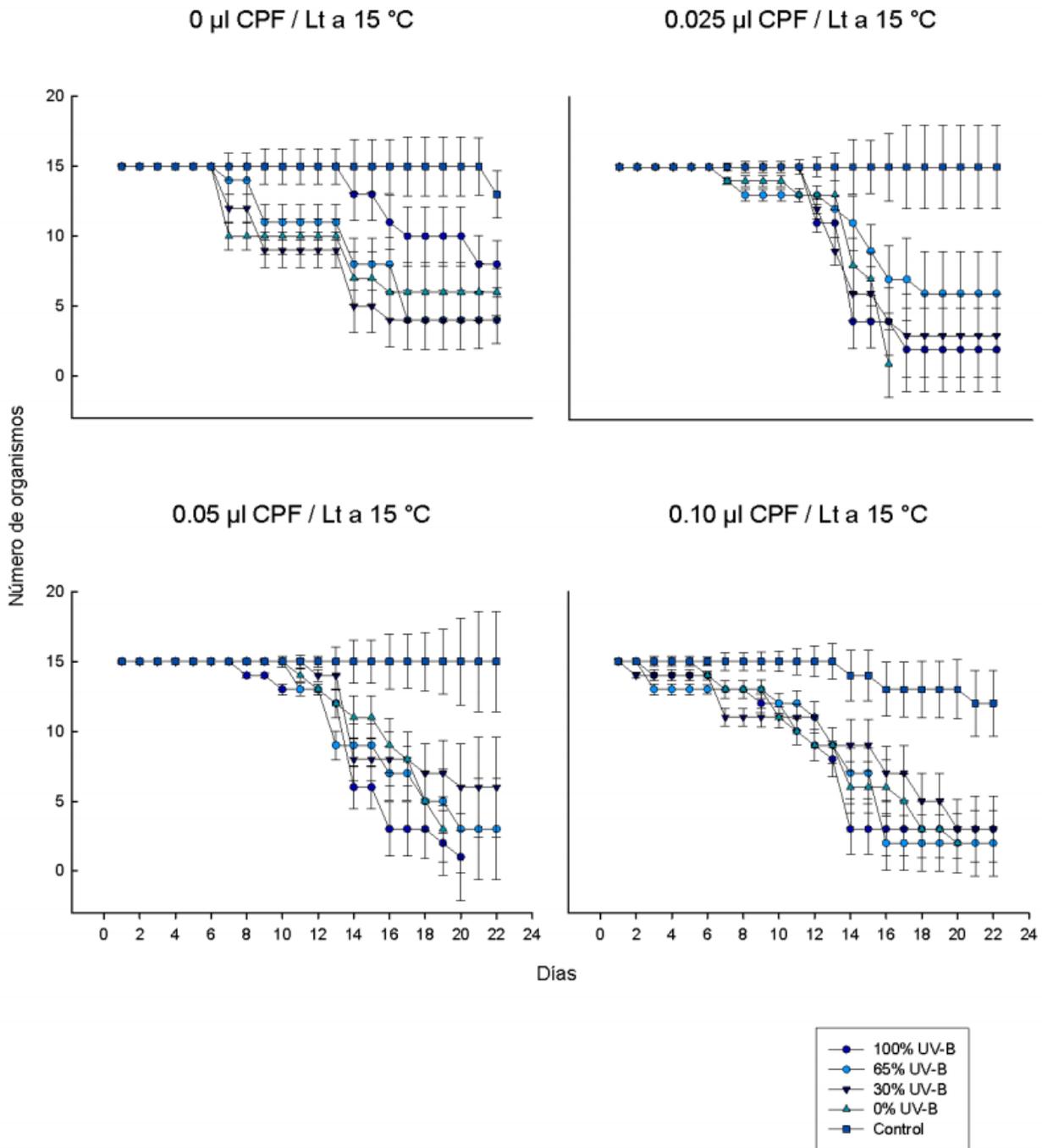
Respecto a la sobrevivencia de los organismos a una temperatura de 15°C, en todos los tratamientos se observó una disminución en el número de organismos conforme pasó el tiempo, siendo especialmente evidente en los tratamientos con una mayor concentración del agroquímico, para el caso de los organismos en la concentración de 0.10 µl CPF/L se observa una baja en la sobrevivencia desde el segundo día, mientras que en las concentraciones de 0, 0.025 y 0.05 µl CPF/L la sobrevivencia se prolongó cinco días para las dos primeras y seis días más para 0.05 0.05 µl CPF/L .

Para el grupo de organismos en la concentración de 0 µl CPF/L se observó una baja de organismos menos prolongada con una incidencia de radiación UV-B del 100%, siendo esto contrario a lo que se esperaba del tratamiento, los organismos presentes en los demás niveles de tratamiento de radiación UV-B se comportaron de la manera esperada, quedando un menor número de organismos al final de las observaciones al 65 y 30% que al 0% de radiación.

A la mayor concentración de 0.10 µl CPF/L se observa una disminución en el número de organismos a partir del segundo día, lo que podría relacionarse con la mayor concentración del agroquímico, ya que el primer deceso observado en todos los demás tratamientos se llevó a cabo entre el sexto y el séptimo día, respecto a la acción sinérgica con la radiación UV-B, está actuó de la manera esperada, siendo mayor la sobrevivencia en el tratamiento de 100%, seguido de las intensidades de 65 y 30% de incidencia de radiación UV-B.

Para el caso de la concentración media de clorpirifos de 0.05 µl CPF/L se observó un comportamiento similar en todos los tratamientos, siendo el primer deceso en el nivel con incidencia del 100% de la radiación UV-B, dándose hasta cuatro días después el deceso de un organismo en otro nivel de tratamiento, siendo en este caso en los tratamiento de 65 y 0% de incidencia de radiación UV-B.

Respecto a la menor concentración, de 0.025 µl CPF/L, se observa que la sobrevivencia se prolongó hasta el día 11 para 100 y 30% de radiación UV-B, siendo los grupos que mayor tiempo permanecieron con todos los organismos vivos. A esta concentración se observa primeramente decesos en los grupos de 65 y 0 % de incidencia de radiación UV-B.



Gráfica 1. Afecciones a la sobrevivencia causadas por el efecto sinérgico de la temperatura, la radiación UV-B y la concentración de clorpirifos sobre *A. mexicanum* en los diferentes tratamientos a una temperatura de 15 °C. Tukey: Tratamientos respecto a la radiación ultravioleta, 100% UV-B (AC), 65% UV-B (AC), 30% UV-B (AB), 0% UV-B (A) y Control (ABC).

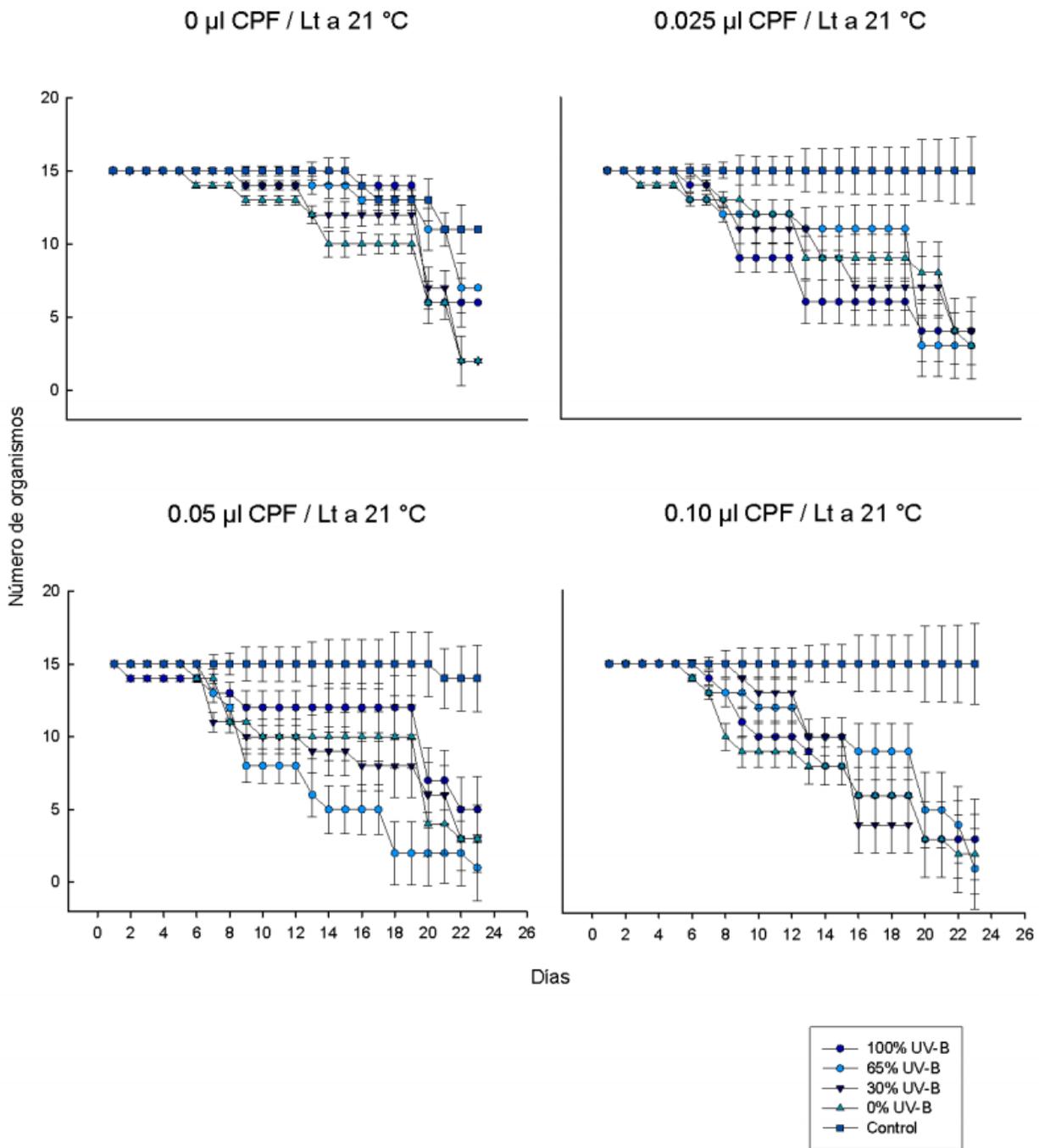
Por otra parte, la sobrevivencia de los tratamientos a la temperatura de 21°C actuó de forma similar que en el tratamiento anterior, observándose una disminución con el pasar del tiempo, siendo particularmente evidente en el tratamiento de 0.10 µl CPF/L, presentándose una mayor sobrevivencia en los tratamientos de 0 y 0.05 µl CPF/L. Las primeras bajas se dieron entre los días 2 y 5 para todos los tratamientos con CPF.

Para 0 µl CPF/L la primera baja se dio en el quinto día con 0% de radiación UV-B dándose otro evento de baja hasta el día 9 donde se conservó el número de organismos hasta el día 19, posterior a este día hubo una disminución en el número de organismos hasta el día 23, último día de observación, quedando siete organismos para el tratamiento a 65%, seis para 100% y un único organismo para las radiaciones de 30 y 0%.

En el caso del tratamiento de 0.025 µl CPF/L sobrevivieron cuatro organismos sometidos a radiaciones de 100 y 30%, y tres organismos para las radiaciones de 65 y 0%. Para esta concentración cabe destacar que hubo un periodo prolongado de entre 10 a 12 días, donde se mantuvieron sin bajas sin importar la incidencia de radiación UV-B

En la concentración de 0.05 µl CPF/L se presentó una mayor sobrevivencia para los organismos en el tratamiento con un 100% de radiación, quedando cinco organismos al final de las observaciones, por otra parte en los tratamientos con una exposición de radiación a 30 y 0% se obtuvo una sobrevivencia final de tres individuos para cada uno y un único sobreviviente para 65% de radiación UV-B. De manera similar a lo observado en 0.025 µl CPF/L hubo un periodo sin bajas de 12 días para las incidencias de 100 y 0% de radiación UV-B.

Por último para la concentración de CPF mayor de 0.10 µl CPF/L sobrevivieron tres individuos para 100%, dos individuos bajo la incidencia de 0% de exposición UV-B y un único individuo con 65%, observándose una baja completa de los individuos presentes en la incidencia de radiación UV-B de 30%, siendo el único tratamiento a esta temperatura con esta característica. Por último, a diferencia de los demás tratamientos en este se observa una baja de manera escalonada durante todo el tiempo de observación.



Gráfica 2. Afecciones a la sobrevivencia causadas por el efecto sinérgico de la temperatura, la radiación UV y la concentración de clorpirifos sobre *A. mexicanum* en los diferentes tratamientos a una temperatura de 21 °C. Tukey: Tratamientos respecto a la radiación ultravioleta, 100% UV-B (AC), 65% UV-B (A), 30% UV-B (AB), 0% UV-B (ABC) y Control (ABC).

Por último, respecto a la sobrevivencia a la mayor temperatura analizada, de 25°C, se observa una baja de la sobrevivencia en un tiempo relativamente corto en comparación a la sobrevivencia de los organismos expuestos a las temperaturas menores. Primeramente es visible la baja de individuos entre los días 2 y 5 para todos los tratamientos con exposición al CPF, aunque de manera similar la baja de individuos en el grupo sin exposición al agroquímico comenzó hasta el sexto día, observándose una disminución completa en el número de organismos al séptimo día.

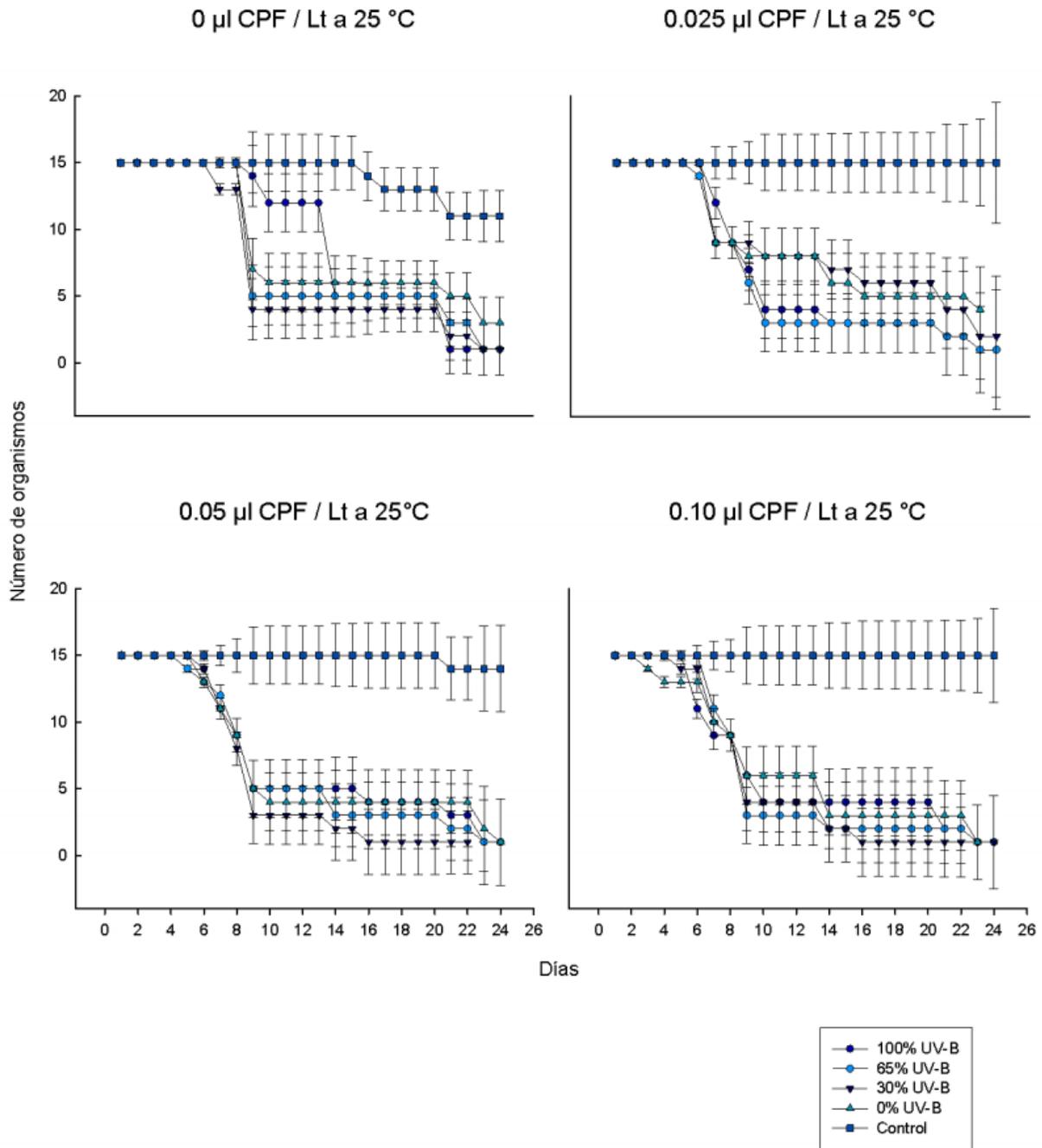
A diferencia de los organismos que fueron expuestos a las temperaturas de 15 y 21°C, para la mayor temperatura se registró una sobrevivencia menor para todos los tratamientos al término de la observación, sin embargo cabe destacar que durante los últimos nueve días de observación para los diferentes tratamientos se conservó relativamente estable el número de organismos después de la disminución de organismos inicial.

Para el tratamiento de 0 µl CPF/L hubo una sobrevivencia de tres individuos con 0% de radiación UV-B y un único individuo para los tres tratamientos restantes. Siendo este el único tratamiento donde no hubo una baja total para ninguna de las incidencias de radiación UV-B.

En el caso de 0.025 µl CPF/L sobrevivieron dos organismos para la incidencia de 30% y un único organismo para 65% de incidencia. A diferencia de los esperado el grupo de organismos con una incidencia de 0% no generó sobrevivientes, de igual manera que el grupo bajo una incidencia de radiación UV-B de 100% donde la baja total era más esperada.

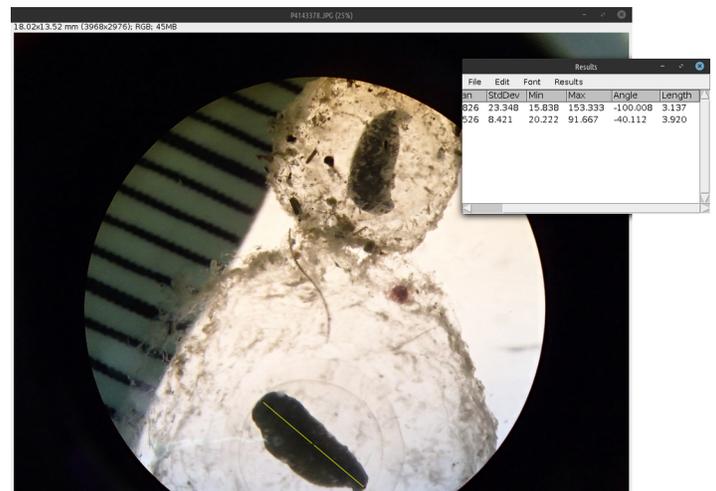
La sobrevivencia en 0.05 µl CPF/L fue extremadamente baja con un único organismo para las incidencias de radiación de 100, 65 y 0%, mientras que en el caso de la incidencia de 30% se observó una baja total de individuos.

De manera similar, el tratamiento de 0.10 µl CPF/L tuvo una sobrevivencia muy baja con un único organismo para todos las incidencias de radiación UV-B con excepción de la incidencia de 0%, donde hubo una baja total.



Gráfica 3. Afecciones a la sobrevivencia causadas por el efecto sinérgico de la temperatura, la radiación UV y la concentración de clorpirifos sobre *A. mexicanum* en los diferentes tratamientos a una temperatura de 25 °C. Tukey: Tratamientos respecto a la radiación ultravioleta, 100% UV-B (AD), 65% UV-B (AB), 30% UV-B (AC), 0% UV-B (ABCD) y Control (A).

La toma de las tallas se realizó con el programa ImageJ, el cual permite calcular, entre otras cosas, la longitud de un objeto dentro de una imagen al tenerse una medida conocida en esta. En este caso se utilizó una regla con graduación estándar en milímetros, teniendo así una medida reconocible dentro de la imagen. La forma en que se realizaron las mediciones con el registro fotográfico fue utilizando la herramienta de línea y generando un trazo de la longitud conocida, en este caso un milímetro, posteriormente en el menú de análisis, con la herramienta de escala, el programa contrapone la medida conocida al número de píxeles que ocupa la línea en la imagen, por último se genera otro trazo sobre el objeto que se busca medir y en el mismo menú se selecciona la herramienta de medida, obteniéndose así la longitud en los valores de la escala escogida.



Figuras 1 y 2. Se muestra la manera en la que se realizaron las medidas de talla con el programa ImageJ, la figura 1 en la izquierda muestra cómo se realizó la toma de escala al realizar un trazo sobre un milímetro de la regla en la imagen, en la figura 2 se muestra la toma de medida del objeto de interés, en este caso el embrión de ajolote, y en la parte superior derecha de muestra cómo últimos valores la longitud de ambos embriones.

Posterior a la toma de medidas con el programa, los resultados de talla obtenidos se analizaron obteniendo las siguientes gráficas. Sin embargo cabe resaltar que a diferencia de los gráficos anteriores donde se observa el total de días, en estos únicamente se representan los días en que se pudo realizar la toma de fotos para ser alojadas en el registro fotográfico y a partir de este poder realizar las mediciones de los organismos a posteriori, razón por la cual el número de días no se acopla con los presentados en las gráficas anteriores.

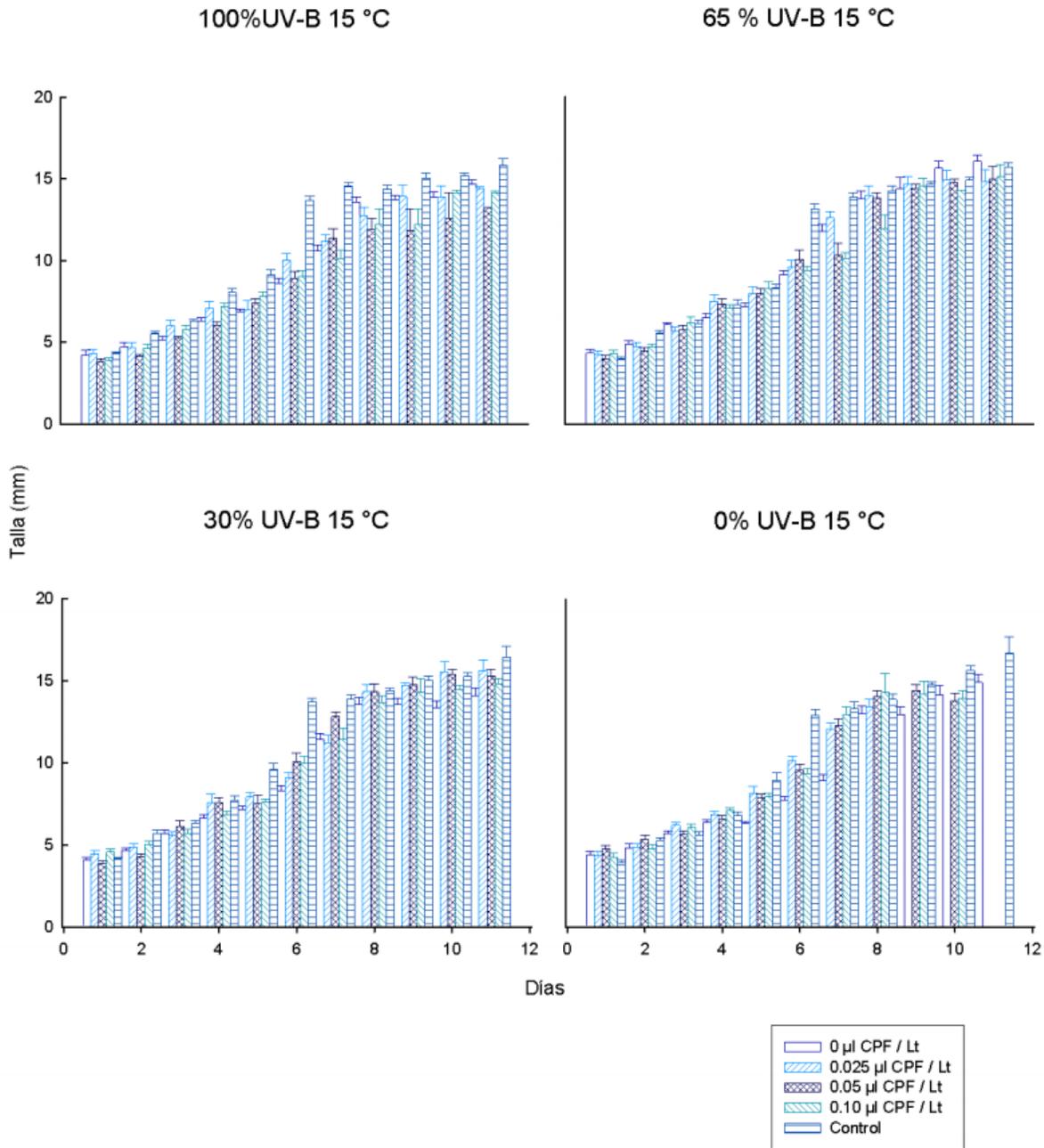
Respecto a la talla de los organismos, en los tratamientos a 15°C se observa un aumento conforme pasó el tiempo, para la incidencia de 100% los organismos que obtuvieron una mayor talla pertenecen al tratamiento sin presencia de CPF, 0.025 y 0.10 µl CPF/L alcanzando una talla media de hasta 14 mm. Mientras que en el tratamiento de 0.05 µl CPF/L con la incidencia del 100% de radiación UV-B lograron alcanzar tallas máximas de 12 mm.

Para el caso de los organismos bajo una exposición de 65% de radiación UV-B aunque existe también un aumento en la talla, no se obtuvieron valores similares, siendo el valor más alto para el grupo de 0 µl CPF/L de 15 mm, respecto a los demás tratamientos la talla máxima para todos fue de 14 mm.

Por otra parte, respecto a los organismos bajo la exposición de 30% de radiación UV-B se observó la mayor talla en los organismos a 0.025 y 0.05 µl CPF/L cercana a los 16 mm, seguido por el resto de tratamientos rondando un máximo de 14.5 mm.

Por último a una exposición de 0% de radiación UV la talla mayor fue alcanzada por organismos en el tratamiento de 0 µl CPF/L siendo esta de 15.5 mm, el resto de tratamientos obtuvieron una talla media aproximada de 14 mm.

Para todos los casos se observa, tal como era previsto, una mayor talla conforme disminuyó la concentración del agroquímico, siendo mayores las tallas para los tratamientos de 0 y 0.025 µl CPF/L, sin que la discrepancia entre las tallas sea muy notoria.



Gráfica 4. Tallas promedio alcanzadas por los organismos bajo los diferentes tratamientos a cada una de las radiaciones de luz UV-B y a una temperatura de 15°C. Tukey: Tratamientos respecto a la concentración de agroquímico, 0 µl CPF / L (ABC), 0.025 µl CPF / L (ABC), 0.05 µl CPF / L (AB), 0.10 µl CPF / L (A) y Control (AC).

De igual manera que las tallas obtenidas en los organismos en la temperatura de 15°C, para la temperatura de 21°C se observa un aumento de talla proporcional en todos los tratamientos con respecto al paso del tiempo. La talla mayor fue cercana a los 16 mm perteneciendo a organismos presentes en el grupo de 0 µl CPF/L con una incidencia de 30%.

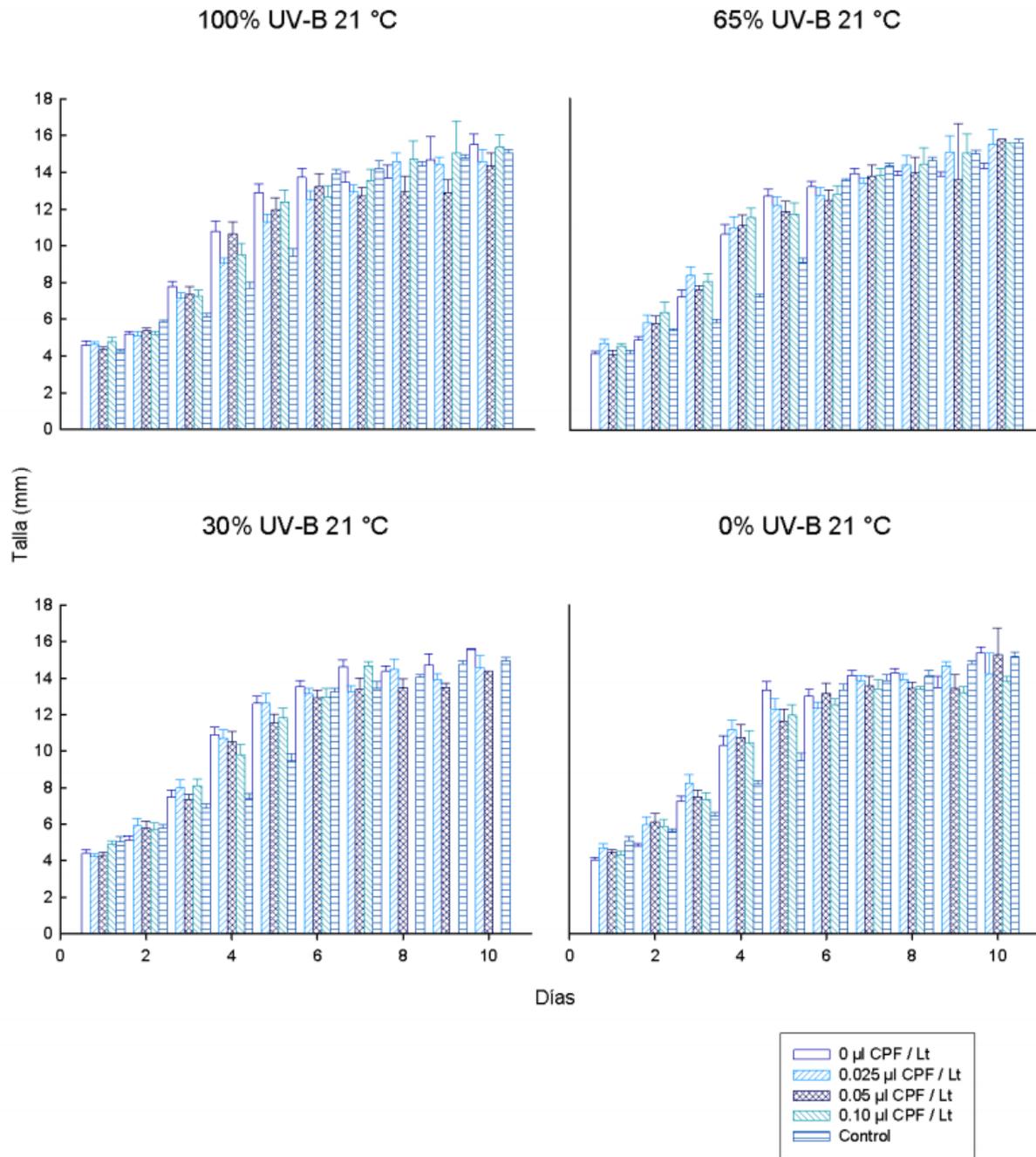
Respecto a la incidencia del 100% de radiación UV-B a esta temperatura la mayor talla fue obtenida por organismos expuestos a 0 y 0.10 µl CPF/L alcanzando aproximadamente 15 mm de talla media, esta es seguida por el tratamiento de 0.025 µl CPF/L con una talla máxima cercana a los 15 mm, obteniendo las menores tallas en el grupo de 0.05 µl CPF/L con un máximo de 14mm.

En los tratamientos con una incidencia del 65% los organismos presentes en los tratamientos con el agroquímico tuvieron una mayor talla que el tratamiento sin el químico, llegando a 15 mm, siendo los organismos del tratamiento de 0 µl CPF/L los que alcanzaron una menor talla, de casi 13 mm, siendo esto contrario a lo esperado.

Por otra parte en la incidencia de 30% exceptuando al grupo de 0 µl CPF/L que ya se mencionó con anterioridad, los organismos en los tratamientos con el agroquímico alcanzaron una talla de 14mm.

Finalmente los organismos pertenecientes a 0 µl CPF/L y al tratamiento de 0.05 µl CPF/L con una incidencia del 0% obtuvieron una talla máxima de aproximadamente 14.5 mm, mientras que los tratamientos de 0.025 y 0.10 µl CPF/L obtuvieron una talla máxima de aproximadamente de 14 y 13.5 mm respectivamente.

De manera similar a lo observado con la temperatura de 15° es notoria la mayor talla para el grupo de 0 µl CPF/L principalmente durante los primeros días, sin embargo en días posteriores los demás tratamientos alcanzan tallas similares, cabe destacar que bajo la incidencia de 65% esto no se observa, terminando por tener una talla menor el tratamiento de 0 µl CPF/L.



Gráfica 5. Tallas promedio alcanzadas por los organismos bajo los diferentes tratamientos a cada una de las radiaciones de luz UV-B y a una temperatura de 21°C. Tukey: Tratamientos respecto a la concentración de agroquímico, 0 µl CPF / L (ABCD), 0.025 µl CPF / L (A), 0.05 µl CPF / L (AC), 0.10 µl CPF / L (AD) y Control (AB).

Por último respecto a la talla los organismos expuestos a la temperatura de 25°C, estos obtuvieron un tamaño ligeramente menor que los organismos presentes en las otras temperaturas.

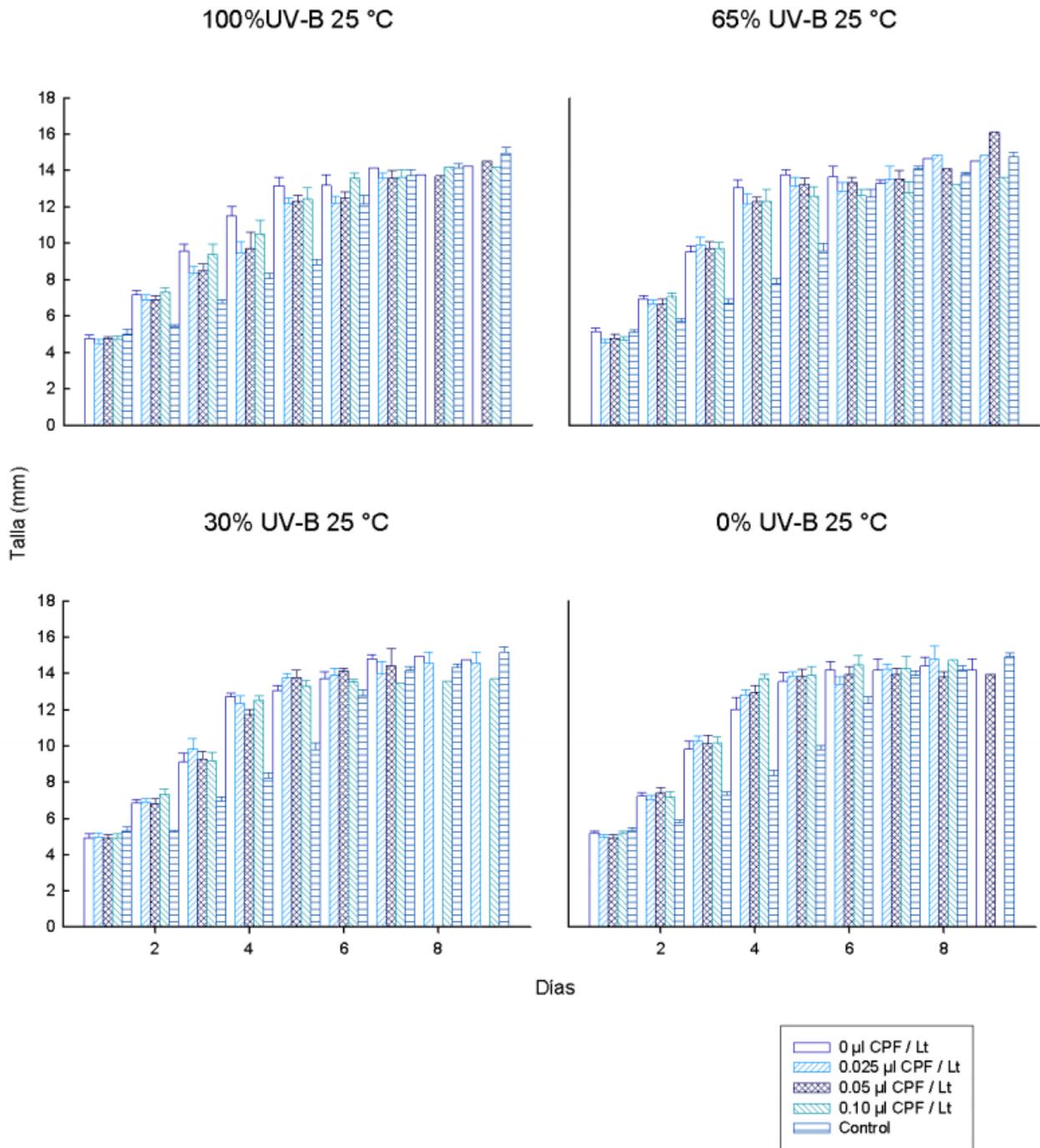
En los tratamientos expuestos a la temperatura de 25°C son los organismos pertenecientes al tratamiento de 0.05 µl CPF/L con una radiación UV-B de 65% los que obtuvieron el mayor tamaño con 15.5 mm.

Pasando a los organismos presentes en los tratamientos bajo una radiación UV-B de 100% fue 0.10 µl CPF/L el que alcanzó la mayor talla, siendo esta de casi 16 mm, seguida de los demás tratamientos con aproximadamente 14 mm.

Los organismos presentes en los tratamientos con radiación UV-B de 65 % alcanzaron tallas de 16 mm, siendo esta del tratamiento de 0.05 µl CPF/L, seguida de los tratamientos de 0 y 0.025 con aproximadamente 14 mm, los organismos con menor talla en este porcentaje de incidencia fue el grupo de 0.10 µl CPF/L con apenas aproximadamente 13 mm.

La incidencia de radiación de 30% obtuvo su valor de talla máximo con los tratamientos de 0 y 0.025 µl CPF/L con 15 mm, mientras que los dos grupos restantes alcanzaron una talla máxima aproximada a los 14 mm.

Con una incidencia de 0% se obtuvo una talla de 14.5 mm para los tratamientos de 0 y 0.10 µl CPF/L, observándose las menores tallas en los grupos de 0.025 y 0.05 donde la talla máxima fue de 14 mm.



Gráfica 6. Tallas promedio alcanzadas por los organismos bajo los diferentes tratamientos a cada una de las radiaciones de luz UV-B y a una temperatura de 25°C. Tukey: Tratamientos respecto a la concentración de agroquímico, 0 µl CPF / L (ABCD), 0.025 µl CPF / L (A), 0.05 µl CPF / L (ABD), 0.10 µl CPF / L (C) y Control (B).

Con respecto al número de organismos que eclosionaron y la velocidad a la cual se llevó a cabo la eclosión se observó hasta cierto punto una disminución en el número de eclosiones, aunque no es tan evidente una afectación en los tiempos en los que se llevó a cabo la eclosión, al menos visualmente.

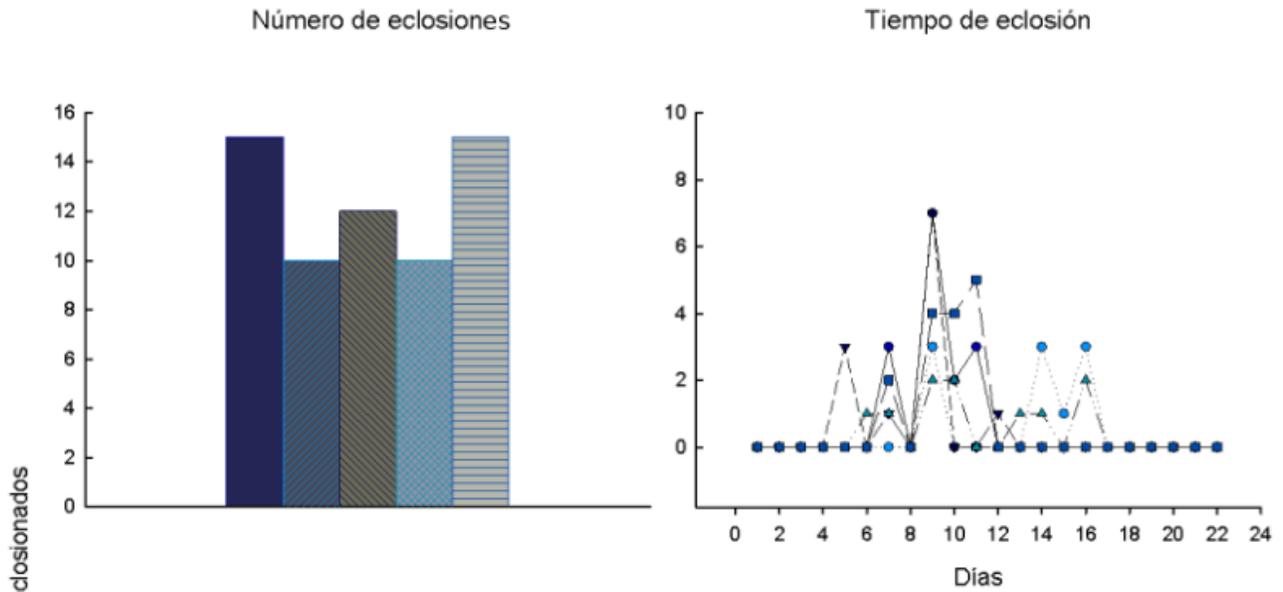
En los organismos bajo las condiciones de temperatura de 15°C y una incidencia UV-B al 100% se observó una mayor eclosión en los grupos de 0 y 0.05 µl CPF/L con quince y doce organismos eclosionados, bajando a diez organismos para 0.025 y 0.10 µl CPF/L. Los primeros eventos de eclosión se llevaron a cabo en el quinto día, siendo el noveno día el que tuvo un mayor número de eclosiones con 19 organismos eclosionados, el día 16 fue el último donde se registró eclosión con un total de cinco.

Para la incidencia al 65% a la misma temperatura se observa una disminución en las eclosiones de todos los tratamientos contando con ocho organismos eclosionados todos los tratamientos con agroquímico y con diez eclosiones el tratamiento sin el químico. En este caso las eclosiones comenzaron a partir del sexto día con tres organismos eclosionados, dándose el mayor número de eclosiones durante el séptimo día con once eclosiones, durante los días 13 a 16 hubo un segundo evento de eclosiones, siendo el último día de eclosión el día 16 con tres.

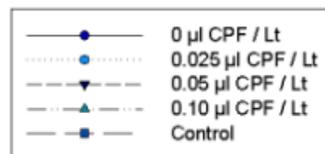
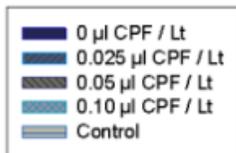
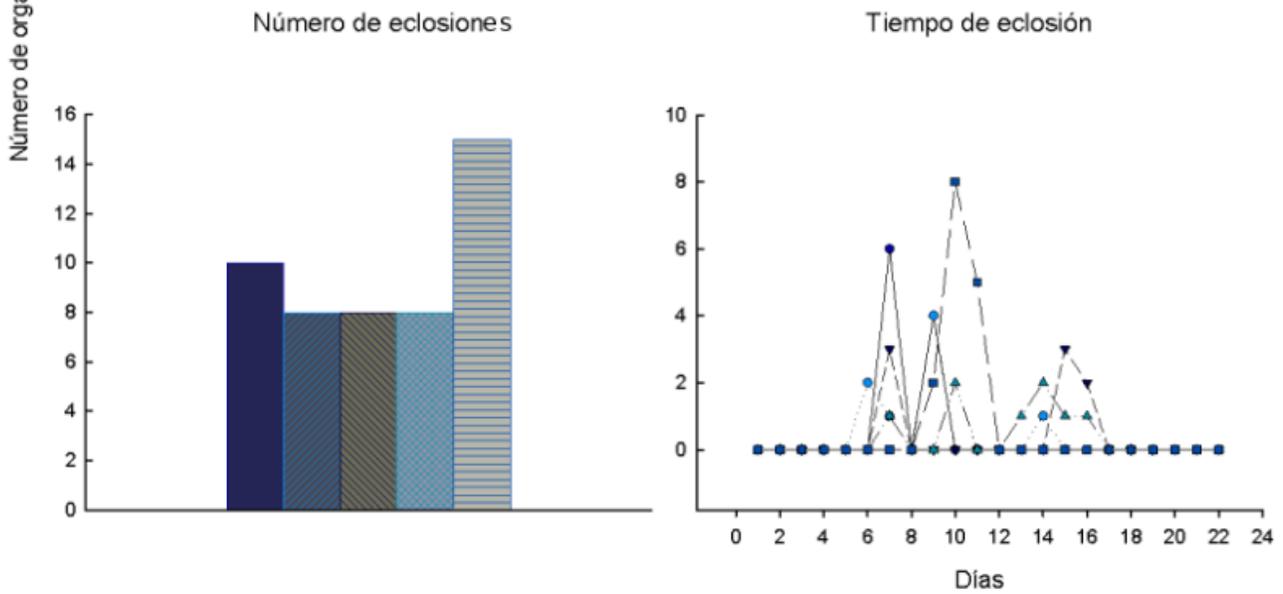
Con una incidencia del 30% se observa un número similar de eclosiones, para los tratamientos de 0 y 0.025 µl CPF/L con ocho organismos eclosionados en cada uno, observándose para el resto de tratamientos una eclosión de once organismos cada uno. Respecto al tiempo de eclosión este se inició al sexto día con una única eclosión, se observaron dos eventos de eclosión durante los días siete y nueve con un total de organismos eclosionados de 11 y 16 respectivamente, durante los días 14 y 15 hubo otro evento de eclosión menor, siendo el día 15 el último en presentar eclosiones.

Por último bajo una incidencia del 0% los grupos con más eclosiones fueron los de 0.05 y 0.10 µl CPF/L con trece organismos eclosionados, seguidos de 0.025 µl CPF/Lt con doce eclosiones, el tratamiento de 0 µl CPF/L por su parte solamente tuvo seis eclosiones. Respecto al tiempo de eclosión en estos, se dio a partir del quinto día con un organismo eclosionado y finalizó al dieciseisavo día con la eclosión de un organismo, el día con mayor número de eclosiones fue el noveno con 17.

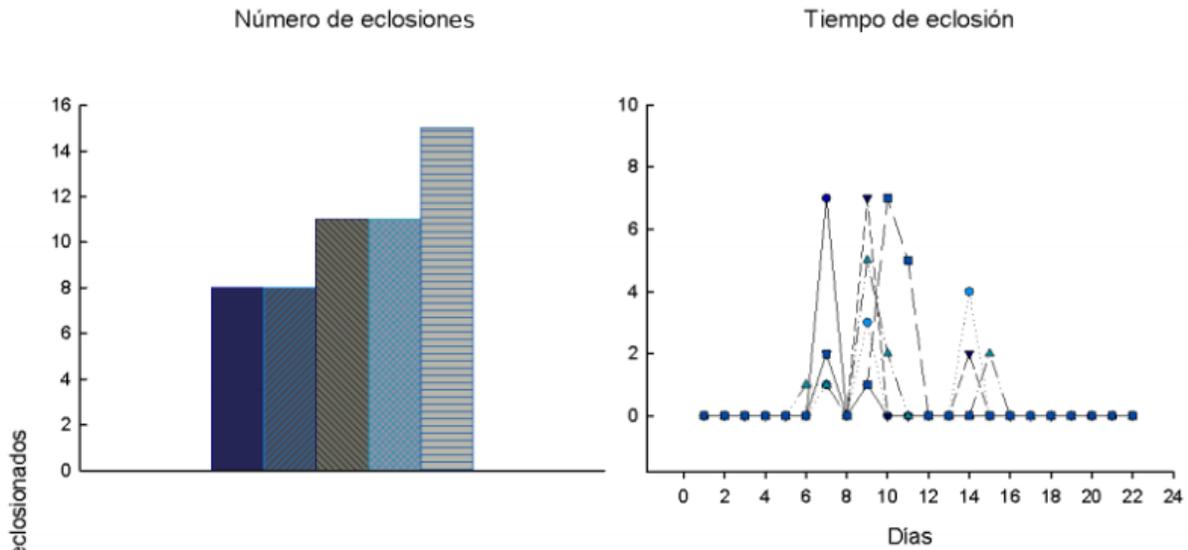
### Eclosión con una incidencia de radiación UV-B de 100 % a 15°C



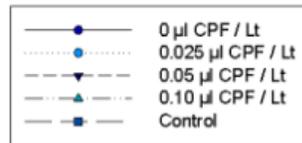
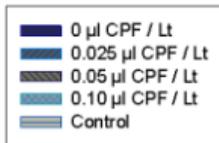
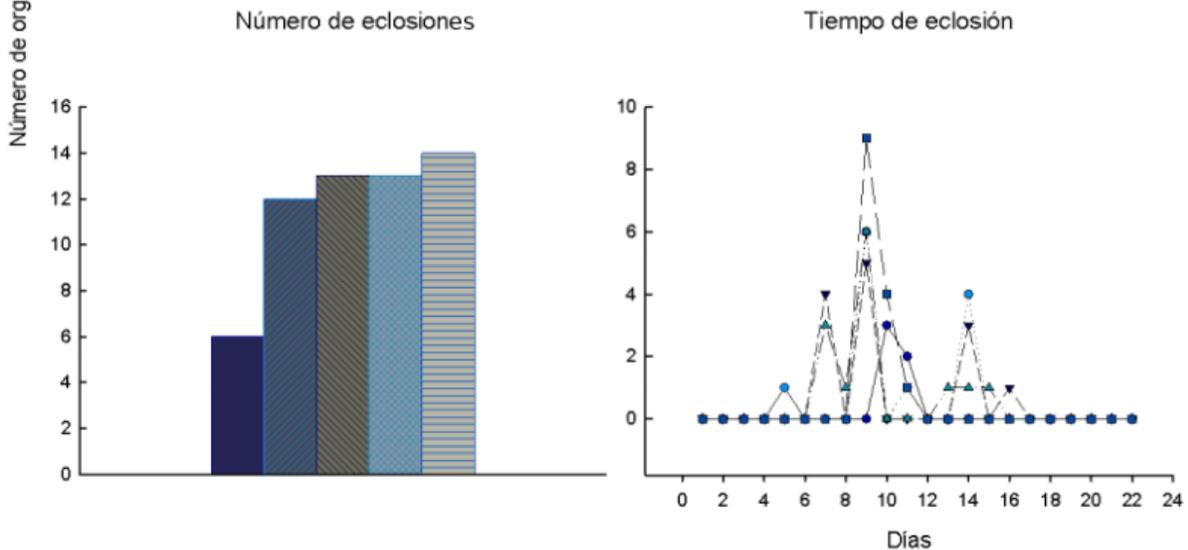
### Eclosión con una incidencia de radiación UV-B de 65 % a 15 °C



### Eclosión con una incidencia de radiación UV-B de 30% a 15 °C



### Eclosión con una incidencia de radiación UV-B de 0% a 15 °C



Gráfica 7. Número de eclosiones y tiempos en las que se realizaron para los tratamientos expuestos a la temperatura de 15°C y las incidencias de radiación UV-B de 100, 65, 30 y 0%.

En la temperatura de 21°C para la incidencia de radiación UV-B del 100% se observa un número de eclosiones similar en los organismos pertenecientes a 0 µl CPF/L con 14 individuos, los tratamientos de 0.025 y 0.05 µl CPF/L contaron con 12 eclosiones, seguido del tratamiento con 0.10 µl CPF/L con once organismos. Respecto al tiempo de eclosión, el primer día donde se registró eclosión fue el séptimo con cinco eclosiones, el día con mayor número de eclosiones fue el noveno con 24 eclosiones y el onceavo día fue el último en contar con registro con la eclosión de dos organismos.

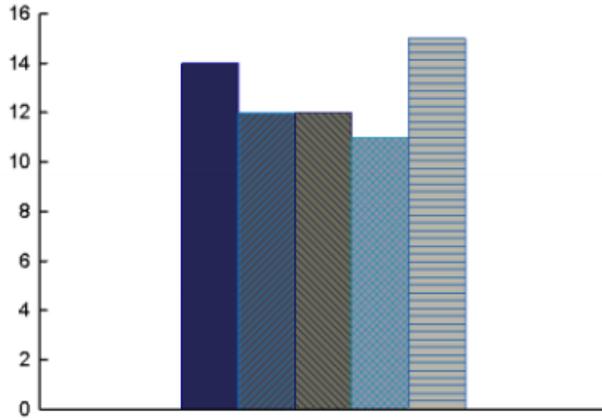
Con la incidencia de radiación UV-B de 65% se observó una disminución en la eclosión en todos los tratamientos, dándose una mayor eclosión en el tratamiento de 0.10 µl CPF/L con diez organismos, seguida de 0 y 0.05 µl CPF/L con ocho y siete organismos respectivamente y por último 0.025 µl CPF/L con seis organismos. El primer día en presentarse eclosión fue el séptimo día con dos eclosiones, el día con mayor número de eclosiones fue el noveno con 24 eclosiones, el último registro de eclosión para esta incidencia de radiación UV-B es el onceavo día con 9 eclosiones.

Para el caso de la incidencia de radiación UV-B de 30% se observó una mayor eclosión en el tratamiento de 0 µl CPF/L con 14 organismos eclosionados, seguido de 0.05 y 0.10 µl CPF/L con once organismos eclosionados cada uno y por último 0.025 µl CPF/L con ocho eclosiones. En este se realizó la primera eclosión en el séptimo día, siendo de cinco organismos, el día con el mayor número de eclosiones fue el octavo con once organismos eclosionados, por último en el día 11 se dio el último evento de eclosión con ocho organismos.

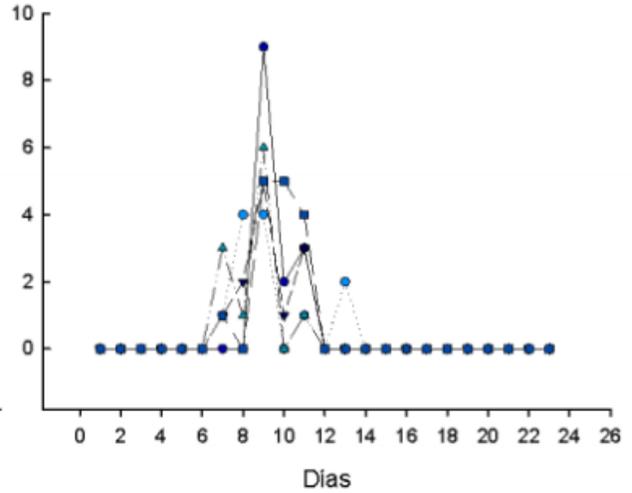
Por último para la incidencia de 0% a esta temperatura se observa una mayor eclosión en el tratamiento de 0.025 µl CPF/L con 13 organismos, seguido de 0.05 µl CPF/L con doce y posteriormente por 0 y 0.10 µl CPF/L con ocho y seis eclosiones respectivamente. En esta incidencia de radiación UV-B el evento de eclosión comenzó el séptimo donde eclosionaron tres organismos, el día con mayor número de eclosiones fue el noveno con 12 eclosiones y el último día de eclosión fue el doceavo día con ocho organismos.

### Eclosión con una incidencia de radiación UV-B de 100% a 21 °C

Número de eclosiones

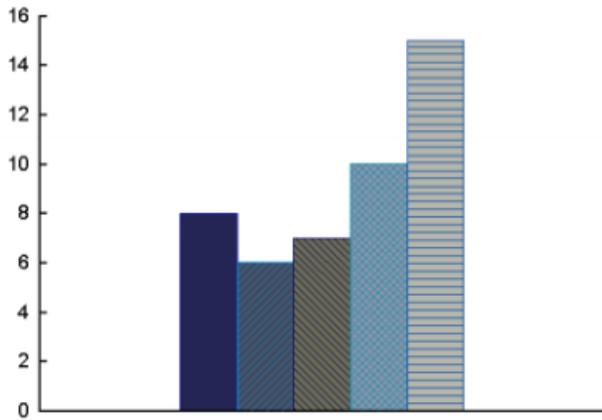


Tiempo de eclosión

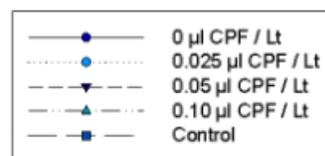
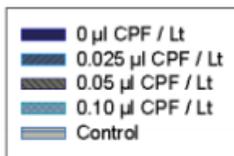
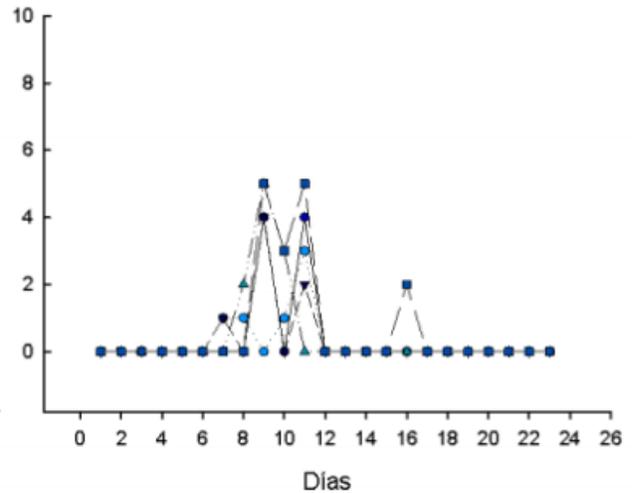


### Eclosión con una incidencia de radiación UV-B de 65% a 21 °C

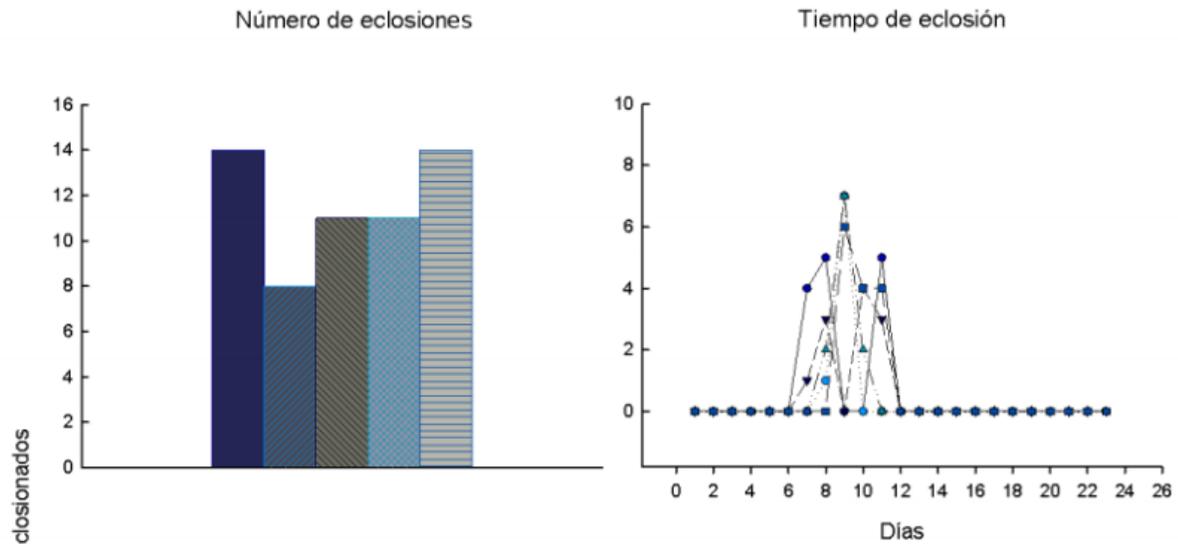
Número de eclosiones



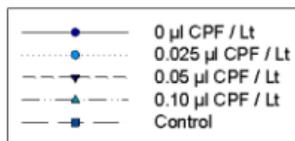
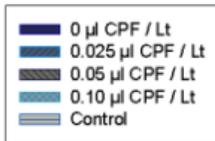
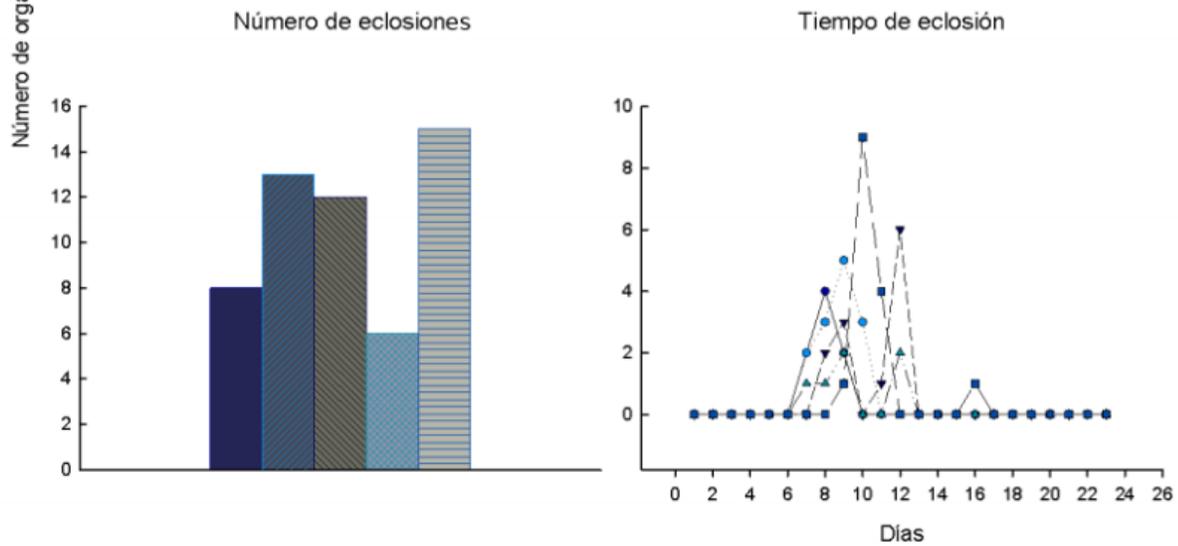
Tiempo de eclosión



### Eclosión con una incidencia de radiación UV-B de 30% a 21 °C



### Eclosión con una incidencia de radiación UV-B de 0% a 21 °C



Gráfica 8. Número de eclosiones y tiempos en las que se realizaron para los tratamientos expuestos a la temperatura de 21°C y las incidencias de radiación UV-B de 100, 65, 30 y 0%.

A diferencia de lo observado en las temperaturas anteriores para la temperatura de 25°C se observó una disminución en el número de eclosiones.

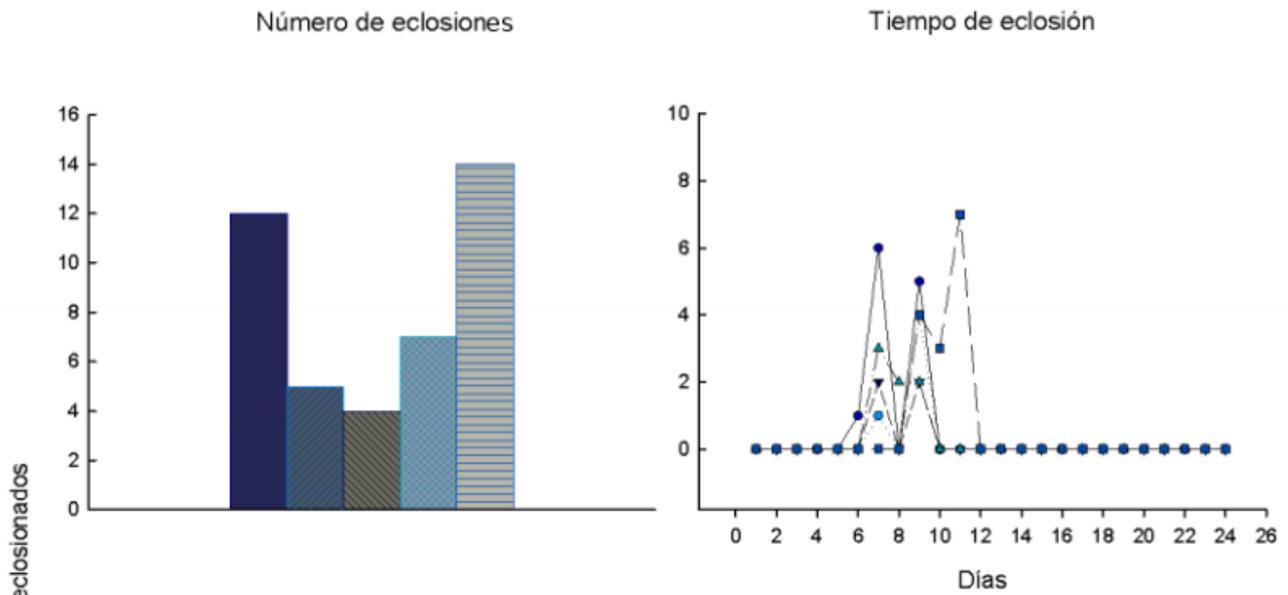
Con base en lo observado, los organismos bajo una radiación UV-B del 100%, donde el mayor número de eclosiones se dio en el grupo de 0 µl CPF/L con 12, seguido de 0.10 µl CPF/L con siete, y por último 0.025 y 0.05 µl CPF/L con cinco y cuatro respectivamente. Sobre el tiempo de eclosión, este se llevó a cabo a partir del sexto día con una eclosión y hasta el noveno con 13, siendo este último donde se observó el mayor número de eclosiones.

Para la incidencia de 65% el mayor número de organismos eclosionados fue en 0.025µl CPF/L con siete organismos, seguido de 0.05 µl CPF/L con seis y por último 0 y 0.10 µl CPF/L con cinco y tres organismos respectivamente. En este caso la primera eclosión se dio en el sexto día, siendo de un solo organismo del tratamiento de 0 µl CPF/L, en el séptimo día se llevaron a cabo el mayor número de eclosiones con un total de nueve, siendo el último día de eclosiones el noveno con tres.

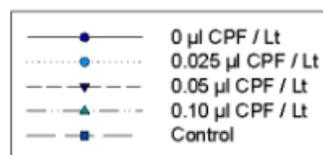
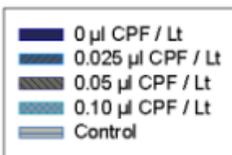
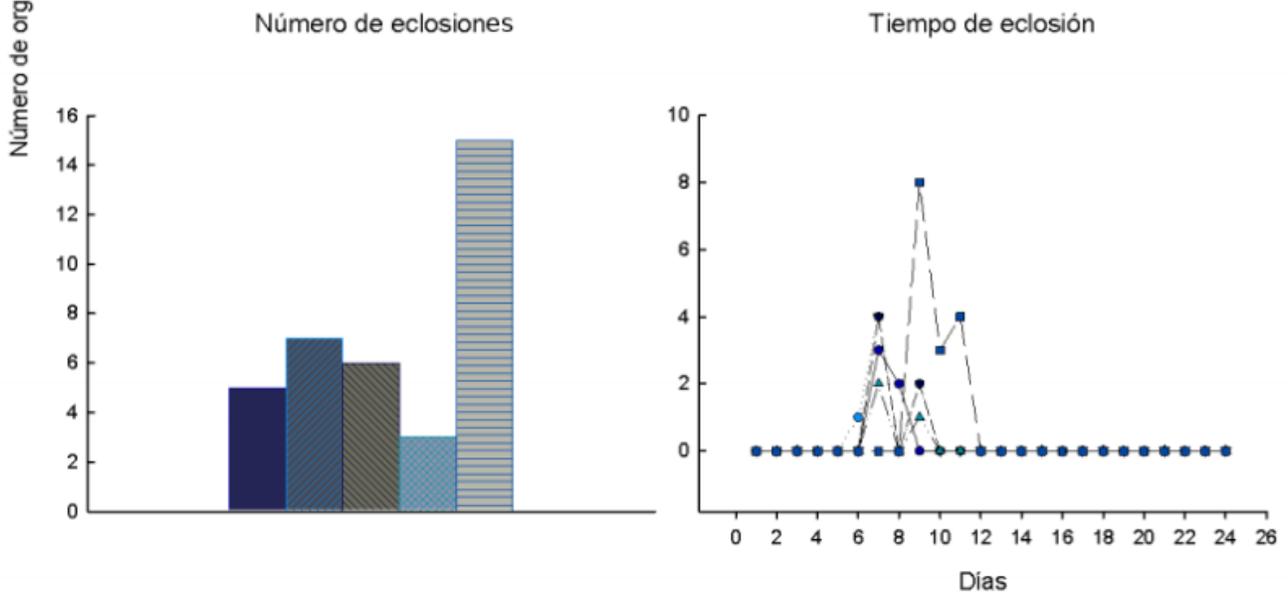
En el caso de la incidencia del 30 %, se obtuvo eclosión de cuatro organismos para 0 µl CPF/L, once eclosiones para 0.025 µl CPF/L y ocho y seis eclosiones para 0.05 y 0.10 µl CPF/L respectivamente. En este, el evento de eclosión comenzó en el sexto día con dos organismos en 0 µl CPF/L, siendo el séptimo día el que presentó mayor número de eclosiones con 16, siendo el último día de eclosiones el noveno con seis.

Por último, para la incidencia de 0% de radiación UV-B, el tratamiento con mayor número de eclosión fue 0.025 µl CPF/L con doce organismos, mientras que el resto de tratamientos obtuvieron solamente seis organismos eclosionados cada uno. En este caso la eclosión comenzó en el séptimo día con 20 organismos, siendo este el día con mayor número de eclosiones y terminó el noveno día con la eclosión de tres organismos.

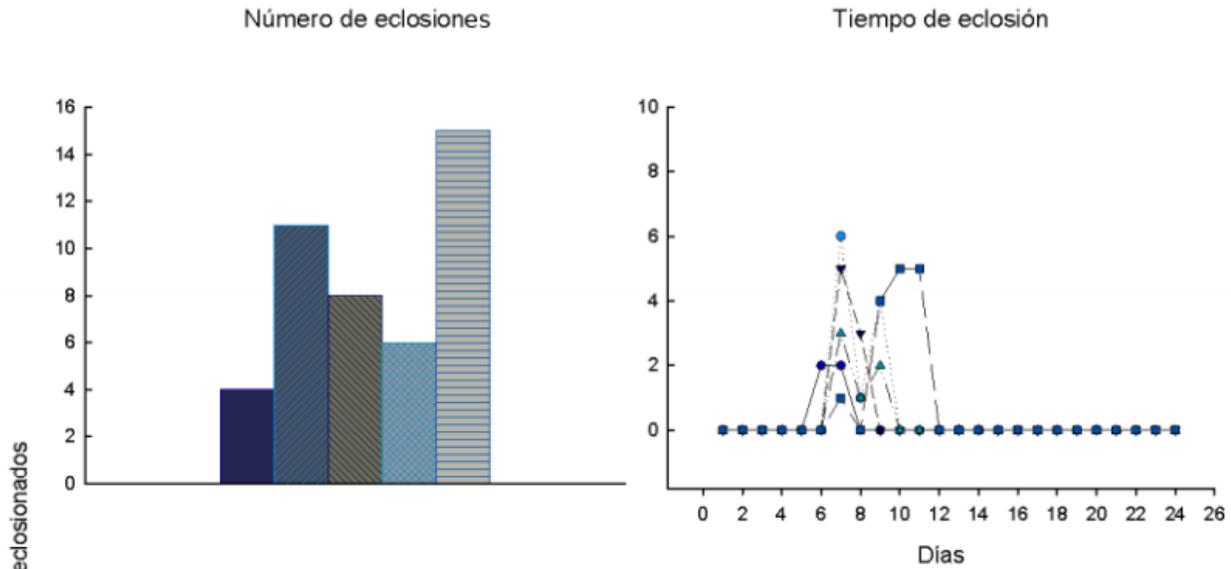
### Eclosión con una incidencia de radiación UV-B de 100% a 25 °C



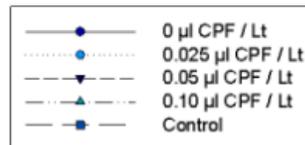
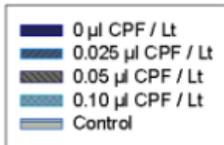
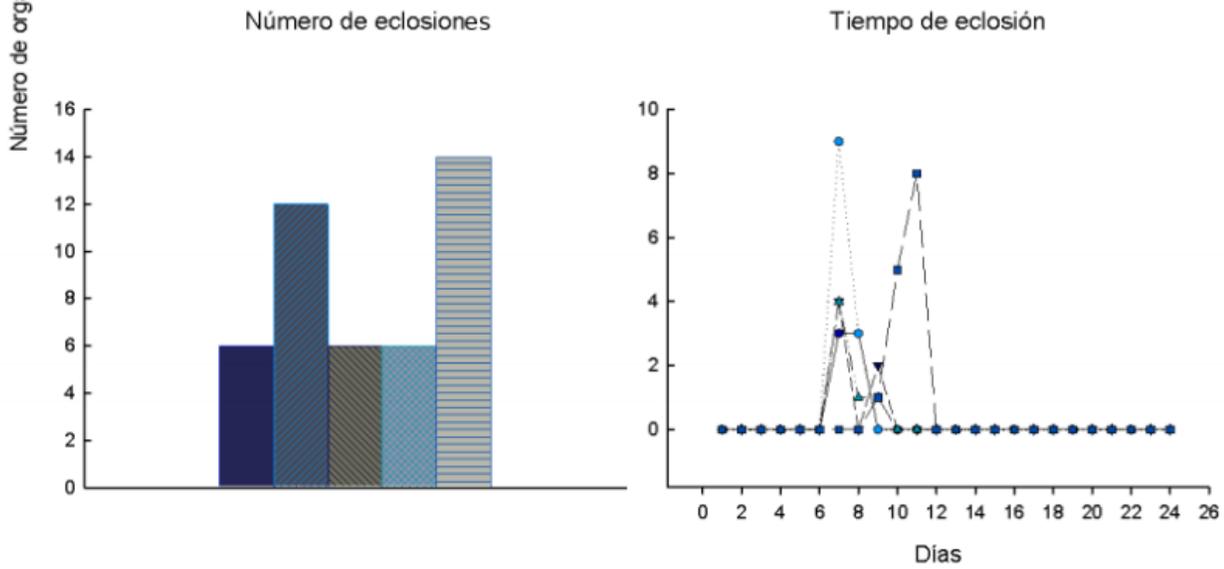
### Eclosión con una incidencia de radiación UV-B de 65% a 25 °C



### Eclósión con una incidencia de radiación UV-B de 30% a 25 °C



### Eclósión con una incidencia de radiación UV-B de 0% a 25 °C



Gráfica 9. Número de eclósiones y tiempos en las que se realizaron para los tratamientos expuestos a la temperatura de 25°C y las incidencias de radiación UV-B de 100, 65, 30 y 0%.

Cabe destacar que los organismos en todos los tratamientos bajo las condiciones de temperatura y radiación UV-B, así como los que incluían las diferentes concentraciones de agroquímico tuvieron una menor sobrevivencia en comparación a los organismos presentes en el grupo control, el cual no estuvo bajo ningún tipo de incidencia de temperatura, ni de radiación o del agroquímico, notándose en este último una muy baja disminución en la cantidad de organismos durante el mismo tiempo de observación, esto se reafirma con los resultados estadísticos obtenidos en el ANOVA de tres vías donde se expresa la existencia de una interacción estadísticamente significativa entre el factor de radiación UV-B y del agroquímico con una  $P = 0.022$ , evidenciando el efecto de estos factores sobre los organismos expuestos, por otra parte, también se presentó una interacción estadísticamente significativa entre la temperatura y la radiación UV-B con una  $P < 0.001$  (Tabla 2).

Respecto a la talla promedio obtenida en todos los organismos, existe una diferencia entre la talla final alcanzada por aquellos bajo la incidencia de los factores con respecto a la talla alcanzada por los organismos del grupo control durante el mismo tiempo de observación, revelándose en el estudio estadístico una interacción estadísticamente significativa entre los factores de temperatura y el agroquímico con una  $P < 0.001$  (Tabla 3), siendo más marcada la diferencia con respecto a la sobrevivencia y la inviabilidad que respecto a la talla.

De manera similar el tiempo de eclosión de los organismos bajo la incidencia de los factores no se vio marcadamente diferente a los tiempos obtenidos por los organismos del grupo control, de hecho para esta no existieron valores estadísticamente significativos (Tabla 4), sin embargo sí es notorio para la mayoría de los casos un número de eclosiones mucho menor en comparación a la observada en el control, disminuyendo con respecto al aumento de los valores de incidencia de temperatura y radiación UV-B y la concentración de agroquímico, observándose mayores casos de inviabilidad con respecto al grupo control en el cual la inviabilidad fue muy baja, en este caso se obtuvieron diferencias significativas entre la interacción de los tres factores, con una  $P < 0.001$  en la interacción entre el factor de radiación UV-B y el agroquímico y la interacción de la radiación UV-B y la temperatura, por su parte en la interacción entre la temperatura y el agroquímico se obtuvo una  $P = 0.022$  (Tabla 5).

<b>Análisis de Varianza de Tres Vías (Sobrevivencia)</b>					
<b>Fuente de Variación</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Temperatura	2	2071.220	1035.610	57.046	< 0.001
UV-B	4	6708.855	1677.214	92.388	< 0.001
Agroquímico	3	456.323	152.108	8.379	< 0.001
Temperatura x UV-B	8	585.723	73.215	4.033	< 0.001
Temperatura x Agroquímico	6	132.358	22.060	1.215	0.296
UV-B x Agroquímico	12	434.410	36.201	1.994	0.022
Temperatura x UV-B x Agroquímico	24	530.048	22.085	1.217	0.216
Residual	1320	23963.231	18.154		
Total	1379	34995.258	25.377		

<b>Análisis de Varianza de Tres Vías (Talla)</b>					
<b>Fuente de Variación</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Temperatura	2	1915.024	957.512	66.251	< 0.001
UV-B	3	104.254	34.751	2.404	0.066
Agroquímico	4	2166.355	541.589	37.473	< 0.001
Temperatura x UV-B	6	155.800	25.967	1.797	0.096
Temperatura x Agroquímico	8	1021.414	127.677	8.834	< 0.001
UV-B x Agroquímico	12	295.332	24.611	1.703	0.060
Temperatura x UV-B x Agroquímico	24	406.634	16.943	1.172	0.255
Residual	6283	90806.746	14.453		
Total	6342	96863.202	15.273		

<b>Análisis de Varianza de tres Vías (Tiempo de Eclosión)</b>					
<b>Fuente de Variación</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Temperatura	2	6.919	3.459	1.950	0.143
UV-B	3	2.118	0.706	0.398	0.755
Agroquímico	4	13.203	3.301	1.860	0.115
Temperatura x UV-B	6	0.637	0.106	0.0599	0.999
Temperatura x Agroquímico	8	2.039	0.255	0.144	0.997
UV-B x Agroquímico	12	5.006	0.417	0.235	0.997
Temperatura x UV-B x Agroquímico	24	4.300	0.179	0.101	1.000
Residual	1320	2341.960	1.774		
Total	1379	2376.362	1.723		

<b>Análisis de Varianza de Tres Vías (Número de Eclosiones)</b>					
<b>Fuente de Variación</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Temperatura	2	104.533	52.267	12.624	< 0.001
UV-B	3	48.067	16.022	3.870	0.022
Agroquímico	4	308.667	77.167	18.638	< 0.001
Residual	24	99.367	4.140		
Total	59	742.333	12.582		

Tablas 2, 3, 4 y 5 en orden de arriba abajo. Resultados del ANOVA de Tres Vías para cada una de las variables de respuesta, enlistándose los factores de estudio, donde DF son los grados de Libertad, SS es la suma de cuadrados y MS es el cociente entre la suma de cuadrados y sus grados de libertad.

También se detectaron malformaciones en organismos presentes en los tratamientos con clorpirifos y no se detectó ningún tipo de malformación en ninguno de los organismos del grupo control. Se detectaron espasmos y movimientos erráticos por parte de los organismos expuestos al agroquímico. Entre las malformaciones detectadas se encuentra la lordosis, que es una curvatura de la espina dorsal, se detectó igualmente la deformación de la boca en algunos de los organismos expuestos, desarrollándose en forma de triángulo y en el caso algunos organismos expuestos al agroquímico se observó una inflamación ventral. Cabe destacar que algunos de los organismos que presentaron esta alteración también presentaron lordosis, se observaron diferencias en las afectaciones en dos organismos dentro del mismo contenedor, uno que no presentó síntomas y otro con inflamación ventral y lordosis, por lo que los organismos podrían ser diferentemente afectados bajo las mismas condiciones. En la mayor temperatura de 25°C se presentó inflamación ventral en muchos de los embriones dentro del huevo, y de igual forma se observó en tres organismos dentro de los tratamientos con clorpirifos que desarrollaron una coloración amarillo mostaza.



Figura 3. Organismos en el tratamiento con una concentración de 0.025  $\mu\text{l/Lt}$  y una incidencia de radiación UV del 0% a 15°C, uno de ellos presenta lordosis y está inflado ventralmente.



Figura 4. Organismo en el tratamiento de 0.05  $\mu\text{l/Lt}$  y una incidencia del 100% de radiación UV a 15°C, el organismo presentó lordosis poco después de su eclosión.

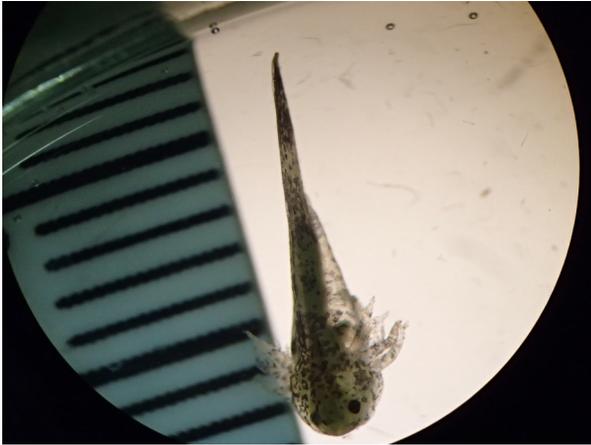


Figura 5. Organismo en el tratamiento de 0.10  $\mu\text{L/L}$  y una incidencia del 100% de radiación UV a 25°C, el organismo presentó un inflamación en la parte ventral.



Figura 6. Organismos en el tratamiento con una concentración de 0.10  $\mu\text{L/L}$  y una incidencia de radiación UV del 30% a 15°C. Los organismos presentaron una deformidad presente en la boca de forma picuda.



Figura 7. Organismo en tratamiento de 0.10  $\mu\text{L/L}$  a 25°C presenta un cambio de coloración a un color amarillento y lordosis.



Figura 8. Organismo en el tratamiento de 0.10  $\mu\text{L/L}$  con incidencia de 65% a 25°C, con el vientre inflado.

## **Discusión.**

Conforme se mantenga un aumento en la cantidad de recursos necesarios para mantener la alimentación de la población humana, también existirá una mayor probabilidad de interacción entre los químicos utilizados para la producción alimentaria y los organismos que se sitúan en las inmediaciones, siendo este el caso de *A. mexicanum* el cual carece de las características necesarias que le permitan desplazarse fuera de la zona donde se presentan estos contaminantes.

Wijesinge et al., 2010 mencionan que para el caso de los anfibios se espera una susceptibilidad mayor a contaminantes acuáticos durante la etapa larvaria de los organismos, esto debido a la presencia de branquias y la condición “desnuda” de la piel de las larvas, así como a la permanencia de estas en el medio acuático, siendo mucho menor la exposición para el caso de los organismos adultos, los cuales después de la metamorfosis queratinizan su piel y pueden permanecer mayor tiempo fuera del agua.

El caso de *A. mexicanum* es particular, ya que este transcurre todo su periodo de vida dentro del agua debido a que posee la cualidad de neotenia, la cual le permite alcanzar etapas reproductivas sin la necesidad de finalizar la metamorfosis, razón por la cual no experimentan la queratinización de la piel y siguen manteniendo las branquias, tales características lo exponen a los contaminantes disueltos en el cuerpo de agua y particularmente en las etapas de vida reproductivas.

Respecto a la sobrevivencia de los organismos bajo la incidencia de las tres variables se observa que ésta es generalmente menor conforme aumentan los valores de incidencia, viéndose de manera escalonada la disminución de organismos en la gráfica, esto difiere con lo encontrado por Cram et al. (2009), quienes reportaron una LC 50 en larvas tempranas a la exposición de CPF a 96 horas en las concentraciones de 0.75 a 1 mg CPF / L observándose en sus resultados una súbita baja de individuos a estas concentraciones.

A diferencia del presente trabajo, Cram et al. (2009) realizaron experimentos con larvas tardías, reportando que la sensibilidad al químico es mayor en larvas tempranas, seguidas de larvas tardías y por último los embriones, siendo estos los más resistentes, esto es similar a lo encontrado en organismos bajo las temperaturas de 15 y 21 °C donde la sobrevivencia de los embriones era mayor en comparación de la sobrevivencia después de la eclosión, a diferencia de estas, a la mayor temperatura de 25 °C se observó una mayor inviabilidad, sin que esto implique una mayor sobrevivencia de las larvas eclosionadas, las cuales a esta temperatura también presentaron una baja sobrevivencia.

Por su parte Castán et al. (2020) sugieren que los efectos de los plaguicidas organofosforados es irreversible en etapas tempranas de la especie, concluyendo esto después de evaluar la tasa de mortalidad utilizando organofosforados malatión y diclorvos (DDVP). Tales efectos se encontraron inclusive a la concentración menor de 5.7 y 1.5 mg/L respectivamente; de manera similar en el presente trabajo se observaron afecciones en la sobrevivencia de los organismos bajo la incidencia del pesticida organofosforado clorpirifos etil, incluyendo aquellos expuestos a la menor concentración de 0.025 µl CPF/L, con la diferencia que en este se evaluó no únicamente la acción del agroquímico, sino su sinergia con la temperatura y la radiación UV-B.

Respecto a las afecciones reportadas por otros autores se ha observado pérdida de equilibrio, afecciones en la actividad motora, convulsiones, espasmos y temblores (Robles et al., 2009), por su parte Cruz (2009) reporta convulsiones, fallo respiratorio y arritmias cardíacas, mencionando que la muerte del organismo puede ser debida a la anoxia (falta de oxígeno en tejidos).

Varias de estas afecciones se reafirman en el presente estudio, tal como son las convulsiones, espasmos y temblores, asimismo se observaron otras afecciones como movimientos erráticos, nado de lado o bocabajo, nula reacción a estímulo físico, boqueo regular en algunos organismos, inflamación ventral presente en organismos después de su eclosión y bajo la incidencia del agroquímico en conjunto a los demás factores, observándose en menor medida en organismos bajo la incidencia de la radiación UV-B y temperatura únicamente (figuras 3 y 5), esta condición se presentó frecuentemente en organismos a la mayor temperatura de 25 °C, por otra parte también se observó una inflamación ventral en varios organismos antes de su eclosión y de manera similar esta condición fue relativamente común en organismos bajo la incidencia de temperatura de 25 °C (figura 8). Esa condición podría haber influido en la gran inviabilidad observada en grupos bajo este último factor, asimismo se reportó un cambio en la coloración de algunos organismos, siendo observado únicamente en organismos bajo la incidencia de la temperatura de 25 °C y bajo algún valor de concentración de agroquímico (figura 7).

Las afecciones con respecto a la movilidad de los organismos se relacionan con la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) que ocasiona el agroquímico, efecto que se ha reportado para los agroquímicos organofosforados; esta enzima trabaja en la sinapsis nerviosa y la disrupción en esta es debida a que el neurotransmisor acetilcolina no es hidrolizado por la AChE, ya que el pesticida termina uniéndose al sitio activo donde debería unirse la acetilcolina para lograr hidrolizarse, terminando por quedar fosforilada y provocando a su vez que la estimulación en las células efectoras sea más prolongada (Cruz, 2009), generándose las reacciones antes mencionadas.

Cabe destacar que las concentraciones reportadas en varios trabajos cambian con respecto a las concentraciones utilizadas en este experimento, la razón podría derivarse de que en otros proyectos se utilizaron Clorpirifos suministrado por laboratorios químicos, mientras que en el presente estudio se buscó utilizar productos que pudieran ser más accesibles para la gente que los utiliza en las tierras de plantación.

Por otra parte en estudios con otros anfibios se han reportado condiciones similares ante la exposición a agroquímicos, tal es el caso de lo reportado por Bacchetta et al. (2008) quienes evaluaron los efectos causados por Carbaryl (CB) en embriones de rana *Xenopus laevis*, observando condiciones como son el edema abdominal, descrito como una condición donde existe un alojamiento de fluidos entre las células generando una inflamación, en concentraciones del agroquímico de 16 y 24 mg/L, siendo esto similar a lo observado en algunos organismos de *A. mexicanum* expuestos a clorpirifos etil donde se observó una inflamación ventral, destacando que esta condición no fue observada en organismos que no estuvieran presentes en el medio con el agroquímico, por lo cual esta afección puede ser únicamente causada por el químico, sin que exista relación con los factores de temperatura y radiación UV-B.

En el mismo trabajo se encontró que inclusive para las menores concentraciones de (CB) de 1, 2 y 4 mg/L esta generaba en las larvas un doblamiento de la notocorda, generando en ocasiones retorcimiento y una orientación errónea de los miotomas (fibras musculares inervadas por un nervio espinal o raquídeo), generando espasmos tetánicos musculares (pulso aplicado a tejido muscular resultante de una contracción simple o nerviosa), así como malformaciones espinales como escoliosis (curvatura en forma de S de la columna dorsal) o la lordosis (curvatura dorsal de la columna dorsal en forma de U).

Bonfanti et al. (2004) evaluaron igualmente en *X. laevis* ocho concentraciones de CPF desde 50 a 6,000 µg/L, encontrando malformaciones en el total de organismos expuestos a partir de la concentración de 750 µg/L, observando afecciones ventrales y/o doblamiento lateral de la cola, así como forma anormal de las branquias, reportando diferencias significativas entre el grupo control, y el tratamiento a partir de 100 µg/L. De manera similar a lo reportado por Bachetta et al. (2008) observaron una orientación errónea de los miocitos, orientándose paralelamente a la notocorda, observando para CPF una flexión en la misma, igualmente los miotomas (donde se agrupan los miocitos) fueron de menor tamaño y deformados en comparación a su control, obteniendo una correlación entre la inhibición de AchE y los porcentajes de malformación con una  $r^2 = 0.97$  y una  $P < 0.01$ .

De manera similar Honrubia et al. (1993) reportaron efectos en la notocorda en renacuajos de *Rana perezi* expuestos al pesticida Carbamato marca ZZ-Aphox, del cual se reporta una acción similar a los pesticidas organofosforados, obteniendo en estos una forma irregular de la notocorda en los organismos tratados, especialmente en dosis mayores, mencionando afecciones en la envoltura conectiva peronotocondrial, la cual se conforma de capas internas de fibroblastos, cubiertos por una capa de fibras de colágeno y una capa externa de fibras elásticas, encontrando en los organismos alimentados con comida contaminada un adelgazamiento en esta estructura, mientras que en organismos dentro del agua contaminada observaron ondulaciones en las fibras de colágeno, seguidas de un curso irregular. Aunque en el presente trabajo no se estudiaron los mecanismos por los cuales la notocorda se afecta, teniendo en cuenta que algunos de estos mecanismos y sus efectos podrían ser especie-específicos, las afecciones observadas en ambas especies de anfibios sugiere que los mecanismos de afección sobre *A. mexicanum* podrían ser los mismos.

Otro agroquímico con una acción similar sobre la AchE en anfibios es el carbamato metomil, este fue evaluado por Seleem (2019) sobre larvas del sapo *Bufo arabicus* exponiendo tres estadios a una concentración de 10 ppm del agroquímico, encontrando en los estadios más jóvenes escoliosis, torsión de la cola y osificación incompleta de la columna vertebral, en organismos del estadio mayor se observó cifosis, que es una curvatura hacia delante de la espina dorsal en forma de n, para *A. mexicanum* lo observado en este trabajo fue la presencia de lordosis la cual se caracteriza por un doblamiento en la espina dorsal al contrario, en forma de U, otra prueba de que algunas afecciones son especie-específicas, de igual manera en *B. arabicus* se encontró retraso de la regresión de la cola, debido a la metamorfosis, falta de formación de apófisis vertebral y problemas de osificación en falanges de los dedos. Con respecto a las afecciones de la notocorda se observó de manera similar en los trabajos anteriores una orientación incorrecta de miotomas con reducción en número y volumen, así como un incremento de espacios extracelulares entre miocitos y regiones vacuoladas.

Lo observado en otros trabajos sobre la acción de pesticidas que influyen en AchE sobre diferentes especies de anfibios constatan una acción similar en *A. mexicanum* bajo la incidencia del clorpirifos etil y en conjunto a las diferentes temperaturas y radiaciones UV-B, sugiriendo daños similares sobre la notocorda, observado afecciones a la movilidad probablemente causadas por problemas en el desarrollo de la notocorda y la orientación de los miotomas, asimismo en varios organismos se observó de manera similar tanto escoliosis como lordosis relacionadas con las problemáticas reportadas en la notocorda.

En otro orden de ideas, la baja viabilidad observada, la cual fue en aumento conforme se elevaron las concentraciones de CPF así como la temperatura y la radiación UV-B sobre los organismos; esto puede parcialmente explicarse debido a que el aumento en la temperatura genera una disminución del oxígeno disuelto presente en el agua, lo cual interfiere en el desarrollo embrionario y puede acelerar o suprimir la eclosión (Dutta, 2018), aunando a la temperatura se tiene el efecto adverso de la sinergia con el agroquímico y la radiación UV-B.

En los organismos que lograron eclosionar, al encontrarse en un medio donde el oxígeno disuelto disminuía conforme aumentaba la temperatura, se esperarían mayores problemáticas en el crecimiento y el desarrollo debido al gasto energético para su movimiento hacia la superficie para respirar (Dutta, 2018); en este caso la diferencia en la talla de los organismos no fue tan evidente visualmente, no obstante las otras variables de respuesta dejan patente que si existen afecciones en los organismos cuando se compararon con lo observado en el grupo control.

En relación a la temperatura Briggs et al. (1984) reportaron que embriones de ajolote mantenidos de 20 a 22 °C presentaron efectos en el desarrollo, particularmente durante la gastrulación, mientras que embriones mantenidos a 10 °C presentaron su desarrollo normal. Los embriones a una temperatura de 18 °C generaron problemáticas como arresto en blástula tardía, gastrulación incompleta, hinchazón del intestino e inhabilidad de establecer circulación normal. En tanto a una temperatura mayor de 25 °C se observó que los embriones detenían su desarrollo antes o durante la gastrulación. En este trabajo *A. mexicanum* presentó una gran inviabilidad en los organismos sometidos a la misma temperatura de 25 °C, esta retención del desarrollo en los organismos podría explicar la acción en conjunto de la radiación UV-B y el agroquímico.

En lo que respecta al tiempo en el que se realizaron las eclosiones, este no se vio afectado, realizándose la gran mayoría de eclosiones entre los días seis y nueve sin importar la incidencia de los factores. Se hubiera esperado que se produjera una eclosión más rápida en los organismos bajo la incidencia de mayores temperaturas. La razón por la cual el tiempo de eclosión de los organismos a mayores temperaturas resultó similar al tiempo de eclosión de organismos sin la incidencia de la temperatura podría deberse a un retraso debido a la interacción con el agroquímico, ya que de manera similar Aydin y Köprücü (2005) reportaron un retraso de la eclosión en la carpa común (*Cyprinus carpio*) con el aumento del agroquímico organofosforado diazinon, mencionando que esto podría ser un mecanismo de defensa ya que el corion del huevo actúa como una barrera contra este tipo de contaminantes.

Por su parte Osterauer y Köhler (2008) reportaron una situación similar utilizando el mismo agroquímico sobre embriones de pez cebra (*Danio reiro*) haciendo mención que este retraso en la eclosión podría deberse a la intervención del químico sobre la actividad de la enzima corinaza, en el incremento de la presión perivitelina, en la contracción muscular y en la toma activa de agua por el embrión, siendo estos procesos relacionados con la eclosión. Por lo que a pesar de desconocerse como se lleva a cabo este proceso en embriones de *A. mexicanum*, se puede intuir que una situación similar pudiera ser responsable de los tiempos de eclosión observados en el presente estudio.

Si bien muchas de las afecciones causadas por los agroquímicos y la temperatura han sido ampliamente reportadas, el caso de la radiación UV-B no ha sido tan estudiado, a pesar de conocerse de manera general que influye en viabilidad de varias especies de anfibios, generalmente disminuyendo la viabilidad de los organismos en desarrollo, tal como lo han llegado a reportar autores como Bancroft et al. (2010).

## **Conclusiones.**

Se evidencia la existencia de un efecto sinérgico de las problemáticas causadas por el calentamiento global como son el aumento de la temperatura y una mayor incidencia de la radiación UV-B en conjunto con la contaminación de agroquímicos sobre las primeras etapas de vida de la especie *A. mexicanum*.

Se demuestra que los organismos expuestos a la sinergia de los factores manifiestan una disminución en su sobrevivencia, siendo principalmente atribuida a la interacción entre la temperatura y el agroquímico, tal interacción se presenta de manera inversamente proporcional a los valores de incidencia de la temperatura y la concentración del agroquímico.

Respecto a la eclosión se evidenció una menor cantidad de organismos con respecto a los valores de los factores, los cuales se relacionan a la interacción de los tres factores, siendo particularmente evidente la inviabilidad con los factores de mayor valor como es el caso de la temperatura a 25 °C. Sin embargo, el tiempo en que se llevó a cabo el evento de eclosión no varió del todo presentándose la mayoría de eclosiones entre los días seis a nueve.

Se observaron diferencias en las tallas alcanzadas por los organismos, siendo estas diferencias explicadas por la interacción de los factores de temperatura y el agroquímico. Las afecciones a la talla de los organismos podrían ser patentes durante toda la vida del individuo, ya que se ha reportado que los daños causados por agroquímicos en estas etapas podrían ser irreversibles.

Con respecto a las afecciones morfológicas observadas en los embriones antes de su eclosión, la más común fue una inflamación ventral cerca de la cabeza, muy observada en organismos bajo las mayores incidencias, muchos de estos organismos no presentaron eclosión. Para complementar el presente trabajo, realizar estudios histológicos para comprender como se lleva a cabo el desarrollo del embrión bajo estos cambios morfológicos y cómo esto deriva en las condiciones morfológicas después de la eclosión en estas condiciones podría ser de gran interés.

Las afecciones morfológicas y de movimiento observadas en los organismos ya eclosionados abarcan la lordosis, la escoliosis y edema ventral desde la cabeza hasta la cloaca, en algunas ocasiones presentándose en conjunto. Respecto a su movimiento se observó nula o leve respuesta a estímulos físicos, movimientos erráticos, boqueo, espasmos y convulsiones.

Por último, el único cambio en la coloración observado se dio en algunos organismos en tratamientos con el agroquímico y bajo la incidencia de temperatura de 25 °C, generando un cambio del color normal marrón suave a una coloración café-amarillenta más brillante, no se observó ningún otro cambio de coloración en ningún otro organismo bajo las demás condiciones.

A pesar de haberse reportado las diferentes afecciones que sufre la especie al interactuar con contaminantes como son los agroquímicos, es insuficiente el trabajo con respecto a las afecciones que pueda sufrir con respecto a la incidencia de luz UV, de igual manera falta conocimiento con respecto a las afecciones que diversas problemáticas generan sobre la especie en conjunto.

Sería de interés realizar más pruebas con rangos de temperatura más amplios para poder identificar de mejor manera los gradientes de sinergia entre los tres factores evaluados, de igual manera realizar este tipo de estudio en diferentes estadios de la especie ayudaría a comprender las diferencias en el nivel de afecciones que un mismo valor del factor puede generar.

## Referencias Bibliográficas.

1. Andrea, Dardo; Baldo, Diego; Beltrán, Juan; Duarte, Helder; González, Alejandro; Katzenberger, Marco; Marangoni, Federico; Richter, Alex; Tejado, Miguel. 2012. *Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities*. En “Global Change Biology” (18). España.
2. Arias, Sandra; Chaparro, Diego; Correa, Felipe; Ramírez, Pedro; Rivera, Raul. 2018. *Factors of global warming (UV-B radiation and temperature) affecting larval development of Ambystoma granulorum*. UNAM. Ciudad de México, México.
3. Aydin, Rahmi; Köprücü, Kenan. 2005. *Acute toxicity of diazinon on the common carp (Cyprinus carpio L.) embryos and larvae*. En “Pesticide Biochemistry and Physiology (82).
4. Bachetta, Renato; Mantecca, Paride; Andrioletti, Manuela; Vismara, Claudio; Vailati, Giovanni. 2008. *Axial-skeletal defects caused by Carbaryl in Xenopus laevis embryos*. En “Science of Total Environment” (392).
5. Badii, Mohammad; Varela, S. 2008. *Insecticidas organofosforados: Efectos sobre la salud y el ambiente*. CULCyT. (5:28). Chihuahua, México.
6. Bancroft, Betsy; Blaunstein, Andrew; Gersavi, Stephanie; Lawler, Joshua; Searle, Catherine; Walls, Susan. 2010. *Direct and indirect effects of climate change on amphibian populations*. En “Molecular Diversity Preservation International. *Diversity*”. Basel, Suiza.
7. Bancroft, Betsy; Barker, Nick; Garcia, Tiffany. 2013. *A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians*. En “Sciences of Total Environment” (449). Estados Unidos.
8. Belden, Lisa; Blaunstein, Andrew. 2003. *Amphibian defenses against ultraviolet-B radiation*. En “Evolution & Development”. (5:1) págs. 89-97.

9. Bishop, Christine; de Solla, Shane; Elliott, John; Pettit, Karen. 2002. *Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) in eggs of red-legged frogs (Rana aurora) and northwestern salamanders (Ambystoma gracile) in an agricultural landscape*. En “Chemosphere” (46). Canada.
10. Blaunstein, Andrew; Belden, Lisa; Green, David; Kiesecker, Joseph; Olson, Deanna; Root, Terry. 2002. *Amphibian phenology and climate change*. En Wiley. “*Conservation Biology*”. págs. 1454 y 1455.
11. Bojorquéz, Luis; Esquivel, Alfonso. 2017. *Contaminación química en la ZLX*. En Bojorquéz, Luis. “*Contaminación química y biológica en la zona lacustre de Xochimilco*”. UAM. Ciudad de México, México. pág. 114.
12. Bonfanti, Patrizia; Colombo, Anita; Orsi, Federica; Nizzetto, Ilaria; Andrioletti, Manuela; Bacchetta, Renato; Mantecca, Paride; Fascio, Umberto; Vailati, Giovanni; Vismara, Claudio. 2004. *Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on Xenopus laevis development*. En “*Aquatic Toxicology*” (70:3).
13. Briggs, Robert; Briggs, Françoise. 1984. *Discovery and initial characterization of a new conditional (temperature-sensitive) maternal effect mutation in the axolotl*. En “*Differentiation*” (26:1-3).
14. Castán, Yutzil; Arias, Sandra; Rojo, Ernesto; Cervantes, Edgar; Ramos, Iram; Solís, Oscar. 2020. *The mexican axolotl's (Ambystoma mexicanum) early development and survival is affected by commercial grade malathion and dichlorvos organophosphorus pesticides*. En “*Revista Internacional de Contaminación Ambiental*” (36:3).
15. Contreras, Victoria; Martínez, Enrique; Valiente, Elsa; Zambrano, Luis. 2009. *Recent decline and potential distribution in the last remnant area of the microendemic Mexican axolotl (Ambystoma mexicanum)*. UNAM. Ciudad de México. México.

16. Cram, S; García, C; Hernández, M; Robles, C; Vanegas, C. 2009. *Organophosphorus pesticides effects on early stages of the axolotl Ambystoma mexicanum (Amphibia: Caudata)*. UNAM. Ciudad de México. México.
17. Cruz , Leopoldo. 2009. *Desarrollo de un método analítico para la determinación de trazas de pesticidas organofosforados por dispersión de matriz en fase sólida-cromatografía de líquidos de alta resolución en Ambystoma mexicanum*. UNAM. Ciudad de México. México.
18. Denöel, Mathieu; Galloy, Valérie. 2010. *Detrimental effect of temperature increase on the fitness of an amphibian (Lissotriton helveticus)*. Universidad de Liege. Liege. Bélgica.
19. Ding, Guo; Fan, Xiao-Li; Lin, Zhi; Sao, Wei-Wei; Wei, Li; Yu, Miao. 2014. *Acute and joint toxicity of three agrochemicals to Chinese tiger frog (Hoplobatrachus chinensis) tadpoles*. Universidad de Lishui. Lishui. República Popular de China.
20. Dutta, Himangshu. 2018. *Insights into the impacts of three current environmental problems on amphibians*. Universidad de Assam. Assam. India.
21. Ecimovic, Sandra; Velki, Mirna. 2015. *Changes in exposure temperature lead to changes in pesticide toxicity to earthworms: A preliminary study*. Universidad de Osijek. Osijek. Croacia.
22. Flores-Villeda, Oscar; Griffiths, Richard; McKay, Jeanne; Mosig Reidl, Paola; Parra-Olea, Gabriela; Shaffer, Brad; Wake, David; Zambrano, Luis. 2010. *Ambystoma mexicanum. The IUCN Red List of Threatened Species* <sup>a</sup>.
23. Flores-Villeda, Oscar; Mendoza, Cinthya; Parra, Gabriela. 2014. *Biodiversidad de anfibios en México*. En “Revista Mexicana de biodiversidad”. Ciudad de México. México. pág. 461 <sup>b</sup>.
24. Hernández, Jesús. 2009. *Metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados en ajolote. Ambystoma mexicanum*. UNAM. Ciudad de México. México.

25. Hernández, Jesús; Hernández, Manuel; Ponce de León, Claudia; Robles, Cecilia; Rojo, Francisco; Vanegas, Cecilia. 2013. *Extracción asistida por microondas y limpieza en fase sólida como método de análisis para la determinación de plaguicidas organofosforados en Ambystoma mexicanum*. UNAM. Ciudad de México, México.
26. Hernández, Jesús; Ponce de León, Claudia; Robles, Celilia; Vanegas, Cecilia; Zuñiga, Sebastian. 2011. *Esterases activity in the axolotl Ambystoma mexicanum exposed to chlorpyrifos and its implication to motor activity*. UNAM. Ciudad de México, México.
27. Honrubia, Pilar; Herráez, Paz; Alvarez, Rafael. 1993. *The carbamate insecticide ZZ-Aphox induced structural changes in gills, liver, gall-bladder, heart, and notochord of Rana perezi tadpoles*. En “Archives of Environmental Contamination and Toxicology” (25).
28. INAFED. Consultado el 21 de febrero de 2020. *Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México*. Ciudad de México, México:  
<http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM90DF/delegaciones/09013a.html>
29. INEGI. 1996. *Cuaderno Estadístico Delegacional, Xochimilco, Distrito Federal*. Aguascalientes, México. INEGI. págs. 3 y 10.
30. Jiménez, Blanca. 2001. *La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada*. Ciudad de México, México. Limusa. pág. 173 .
31. Langlois, Valérie; Navarro, Laia; Reynaud, Stéphane; Thomson, Paisley; Trudeau, Vance; Zhang, Wo Su. 2020. *Agrochemicals disrupt multiple endocrine axes in amphibians*. en *Molecular and Cellular Endocrinology* (513). Canadá.
32. López, Zitlali; Novelo, Eberto; Tavera, Rosaluz. 2015. *El fitoplancton de un canal de Xochimilco y la importancia de estudiar ecosistemas acuáticos urbanos*. UNAM. Ciudad de México, México.

33. Mercado, B; Cram, Silke; Rosas, Irma; Hernández, Manuel; Ponce de León, Claudia. 2015. *Organophosphorus and organochlorine pesticides bioaccumulation by Eichhornia crassipes in irrigation canals in an urban agricultural system*. En “International Journal of Phytoremediation”. (17:7).
34. Osterauer, Raphaela; Köhler, Heinz. 2008. *Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embrionic development of zebrafish (Danio rerio)*. En “Acuatic Toxicology (86).
35. Ortega, Manuel. 1992. *Riego con aguas servidas en Xochimilco, México DF, México*. En “Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Prevención de la contaminación del agua por la agricultura y problemas afines*”. Santiago, Chile. págs. 141 y 143.
36. PAGES 2k Network. 2013. *Continental-scale temperature variability during the past two millennia*. En “Nature Geoscience”.
37. Ruiz, Ángel; López, Erika. 2015. *Estimación de la respuesta térmica de la cuenca lacustre del Valle de México en el siglo XVI: un experimento numérico*. UNAM. Ciudad de México. México.
38. Seleem, Amin. 2019. *Teratogenicity and neurotoxicity effects induced by methomyl insecticide on the developmental stages of Bufo arabicus*. En “Neurotoxicology and Teratology” (72).
39. Sivaramanan, Sivakumaran. 2015. *Global warming and climate change, causes, impacts and mitigation*. Battaramulla, Sri Lanka. págs. 3 y 4.
40. Stephan-Otto, Erwin. 1996. *Conservación del ajolote (Ambystoma mexicanum) mediante su cultivo y siembra en el parque ecológico de Xochimilco*. Ciudad de México, México. CONABIO. pág. 4.

41. Stephan-Otto, Erwin. 2003. *El agua en la cuenca de México: sus problemas históricos y perspectivas de solución*. (1). Ciudad de México, México. Patronato del Parque Ecológico de Xochimilco. págs. 74 y 75.
  
42. Wijesinghe, M; Bandara, M; Ratnasooriya, W; Lakraj, G. 2011. *Chlorpyrifos-induced toxicity in Duttaphrynus melanostictus (Shneider, 1799) larvae*. En “Archives of Environmental Contamination and Toxicology” (60).

