

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



“EVALUACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO POR EL INSECTICIDA BACTERIAL *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* EN TILAPIA, *Oreochromis aureus*, DE UN CULTIVO COMERCIAL DE LA PRESA EMILIO LÓPEZ ZAMORA, ENSENADA B. C. MÉXICO.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

EN MANEJO DE ECOSISTEMAS DE ZONAS ÁRIDAS

QUE PRESENTA

YANET GUERRERO RENTERÍA

Ensenada, Baja California, México

Septiembre del 2001

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS

“EVALUACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO POR EL INSECTICIDA BACTERIAL *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* EN TILAPIA, *Oreochromis aureus*, DE UN CULTIVO COMERCIAL DE LA PRESA EMILIO LÓPEZ ZAMORA, ENSENADA B. C. MÉXICO.”

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

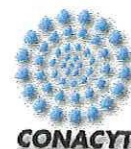
EN MANEJO DE ECOSISTEMAS DE ZONAS ÁRIDAS

QUE PRESENTA

YANET GUERRERO RENTERÍA

Ensenada, Baja California, México

Semtiembre del 2001



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

“EVALUACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO POR EL INSECTICIDA BACTERIAL *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* EN TILAPIA, *Oreochromis aureus*, DE UN CULTIVO COMERCIAL DE LA PRESA EMILIO LÓPEZ ZAMORA, ENSENADA B. C., MÉXICO.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

EN MANEJO DE ECOSISTEMAS DE ZONAS ÁRIDAS

QUE PRESENTA

YANET GUERRERO RENTERÍA

APROBADO POR:



**Dr. Carlos Márquez Becerra
Presidente del jurado
(Director de tesis)**




Dr. Gorgonio Ruiz Campos




M.C. Jorge Alaníz García

Ensenada, B. C., México

Septiembre del 2001

Para la familia... 

A Pedrito... 

Y a los amigos.....“amigos” ustedes saben quienes son... 

RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), particularmente a la Facultad de Ciencias por haberme permitido ingresar al programa de Maestría en Manejo de Ecosistemas de Zonas ÁRIDAS y obtener el grado académico de M.C.

A el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca de estudios con el número de registro 72203, para programas de Maestría.

A mi director de tesis Dr. Carlos Márquez Becerra así también a los sinodales del comité Dr. Gorgonio Ruíz Campos y M.C. Jorge Alaníz García, por apoyarme en la realización de la tesis.

A todos el personal docente de la Facultad de Ciencias que imparten cursos en el programa de Maestría en Manejo de Ecosistemas de Zonas ÁRIDAS, así también a los adscritos a la carrera de Biología, por apoyarme en todo.

A la SEMARNAP y a Fish and Wildservice por apoyarme económicamente durante el segundo año de mis estudios de Maestría.

A el Dr. Jorge Cáceres Martínez del CICESE, jefe del Departamento de Acuicultura, por su apoyo en todo lo requerido para la terminación de este trabajo.

A todas las personas que laboran en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) así como a la institución misma, que de alguna forma apoyaron la realización de este trabajo.

Al M.C. Adrián Mauricio García Ortega, a la Biol. Silvia Elena Valverde Chavarría; M.C. Ma.del Carmen Álvarez Tinajero; M.C. Darla Alejandra Torres Ariño; M.C. Yessica Matas Ruiz y QFB Efrén Ontiveros Llamas, por apoyarme en la terminación de la tesis.

RESUMEN

El número de insectos resistentes a pesticidas sintéticos, se ha incrementado en muchas partes del mundo, por lo que la nueva generación de pesticidas se ha enfocado en el desarrollo de biopesticidas. Tal es el caso de la utilización del *Bacillus thuringiensis* (Bt) como insecticida bacteriano. Este bacilo es específico para plagas de la mosca negra entre otras y es ampliamente aceptado. Sin embargo, en la actualidad existen dudas sobre los efectos deletéreos en especies que no son el blanco de acción. La utilización de peces bioindicadores, son una herramienta valiosa para el monitoreo de la contaminación ambiental. La tilapia *Oreochromis aureus* es un pez con atributos excelentes para estudios de toxicidad, debido a su gran adaptabilidad a condiciones de laboratorio, se conoce información abundante de su ciclo biológico, por su ubicación en la cadenas tróficas como pez herbívoro y por ser un alimento proveedor de proteínas de origen animal, con una alta demanda. En este trabajo se presentan los efectos tóxicos de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* en tilapias, partiendo de la determinación de la concentración letal (CL₅₀). Durante la experimentación se evaluaron: temperatura, pH, concentración de sólidos disueltos, salinidad, oxígeno disuelto, % de saturación de oxígeno, conductividad, cloruros y carbonatos. Se realizaron observaciones sobre varios órganos de los peces, entre ellos; coloración de la branquias, piel y otros. Después se realizó el sacrificio por dislocación cerebral, se extirparon las branquias y el tracto digestivo. A la mitad de las muestras se les aplicó colchicina y choque hipotónico (KCl 0.075 M) con el fin de evaluar cromosomas y a la otra mitad no se le aplicó dichos tratamientos, ya que se utilizaron para evaluar micronúcleos. Las preparaciones se hicieron con raspado de epitelios y se tiñeron con Giemsa. Los resultados muestran que la concentración probada del agente Bt. a 1,000 ppm no es letal, pero sí resulta, subletal conforme transcurre el tiempo de recuperación. Esto es que la mortalidad de individuos ocurre paulatinamente aún en condiciones de agua, oxigenación y alimentación apropiadas. La concentración letal 50 (CL₅₀) ocurre a las 48 horas a una concentración de 5,000 ppm. La concentración de 10,000 ppm es letal para el 100% de los peces a las 48 horas de exposición. En cada una de las concentraciones se observan efectos anormales en el comportamiento de los peces. Las branquias resultaron ser los órganos más sensibles al efecto fisiológico pernicioso resultante de la exposición al pesticida. El daño biológico se manifiesta por la detección de efectos tales como; citotóxico, mitogénico e inducción a la heteroploidosis. La aplicación de Bt como biopesticida pudiera no ser tan inocuo como se ha considerado, se deben realizar más estudios de los efectos provocados en organismos que no son el blanco de acción tanto a nivel ecológico como fisiológico y citotóxico.

INDICE

	Pag.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
II.1 Importancia de la pesquería de la tilapia	14
II.2 Requerimientos medio ambientales para el cultivo de tilapia	15
II.3 ¿Porqué estudiar los efectos biológicos de los pesticidas?	18
II.4 Mecanismo de acción de productos formulados con <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
III. HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVO GENERAL	22
V. OBJETIVOS ESPECIFICOS	22
VI. MATERIALES Y METODOS	23
VI.1 Selección de la especie	23
VI.2 Ubicación del área de estudio	23
VI.3 Condiciones de manejo de los organismos en el laboratorio	25

VI.4 Determinación de cl_{50} y evaluación de daño genético	26
A)FASE I	27
B)FASE II	29
VI.5 ANÁLISIS DE RESULTADOS	30
VII. RESULTADOS	31
A) Concentración letal 50 (CL_{50})	31
B) Calificación de branquias durante la exposición	
1) Calificación de las branquias en experimento I	33
2) Calificación de las branquias en experimento II	34
C) Daño genético	36
D) Parámetros fisicoquímicos del agua	46
VIII. DISCUSION	59
IX. CONCLUSIONES	72
X. BIBLIOGRAFIA	75
XI. ANEXOS	81

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Fig. 1 Acción de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> en gusano barrenador.	21
Fig. 2 Ubicación de la presa Emilio López Zamora.	24
Fig. 3 Diagrama de flujo del diseño experimental.	26
Fig. 4 Concentración letal 50 (LC ₅₀) en la tilapia <i>Oreochromis aureus</i> para las concentraciones probadas de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> a 1000, 5000 y 10000 ppm.	32
Fig. 5 Calificación de las branquias de <i>Oreochromis aureus</i> antes y después de la exposición al biopesticida <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> en el experimento I a una concentración de 1,000 ppm.	33
Fig. 6 Calificación de las branquias de <i>O. aureus</i> antes y después de la exposición al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> en el experimento II en las concentraciones de 5,000 y 10,000 ppm.	34
Fig. 7 Valores de temperatura registrados en el experimento I durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> a una concentración de 1,000 ppm.	47
Fig. 8 Valores de temperatura registrados en el experimento II, durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> en las concentraciones de 5,000 y 10,000 ppm.	47
Fig. 9 Valores de pH registrados durante el experimento I durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> a una concentración de 1,000 ppm.	48
Fig. 10 Valores de pH registrados durante el experimento II durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> . a una concentración de 5,000 y 10,000 ppm.	48
Fig. 11 Valores de Oxígeno disuelto registrados durante el experimento I durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> . a una concentración de 1,000 ppm.	51

Fig. 12	Valores de Oxígeno disuelto registrados durante el experimento II durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> . a una concentración de 5,000 y 10,000 ppm.	51
Fig. 13	Valores de salinidad durante el experimento I durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> . a una concentración de 1,000 ppm.	52
Fig. 14	Valores de salinidad durante el experimento II durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> . a una concentración de 5,000 y 10,000 ppm.	52
Fig. 15	Valores del total de sólidos disueltos registrados en el experimento I durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> . a una concentración de 1,000 ppm.	54
Fig. 16	Valores del total de sólidos disueltos registrados en el experimento II durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> . a una concentración de 5,000 y 10,000 ppm.	54
Fig. 17	Valores de conductividad eléctrica registrado en el experimento I. durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> . a una concentración de 1,000 ppm.	55
Fig. 18	Valores de conductividad eléctrica registrado en el experimento II. durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> . a una concentración de 5,000 y 10,000 ppm.	55
Fig. 19	Valores registrados para cloruros en el experimento I. durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> . a una concentración de 1,000 ppm.	57
Fig. 20	Valores registrados para cloruros en el experimento I durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> . a una concentración de 1,000 ppm.	57
Fig. 21	Valores registrados de carbonatos el experimento I durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> . a una concentración de 1,000 ppm.	58
Fig. 22	Valores registrados de carbonatos el experimento II durante la exposición de la tilapia <i>O. aureus</i> al biopesticida <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> . a una concentración de 5,000 y 10,000 ppm.	58

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Comparación de los porcentajes de heteropicnosis obtenidos en lotes controles y experimentales, durante la exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.	36
Tabla 2. Comparación de los porcentajes de índice mitótico obtenidos en lotes controles y experimentales, durante la exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.	37
Tabla 3. Comparación de los porcentajes de micronúcleos obtenidos en lotes controles y experimentales, durante la exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.	38
Tabla 4. Comparación de los porcentajes de heteropicnosis registrados en las tres concentraciones probadas durante la exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.	39
Tabla 5. Comparación de los porcentajes de índice mitótico registrados en las tres concentraciones probadas durante la exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.	40
Tabla 6. Comparación de los porcentajes de micronúcleos registrados en las tres concentraciones probadas durante la exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.	41
Tabla 7. Comparación de los porcentajes de heteropicnosis de tratamientos de exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.	42
Tabla 8. Comparación de los porcentajes de índice mitótico en tratamientos de exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.	42
Tabla 9. Comparación de los porcentajes de micronúcleos en tratamientos de exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.	43
Tabla 10. Comparación de los porcentajes de heteropicnosis, de tratamientos de exposición, recuperación, exposición versus recuperación y órgano-parámetro, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.	43
Tabla 11. Comparación de los porcentajes de índice mitótico de tratamientos de exposición, recuperación, exposición versus recuperación y órgano-parámetro, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.	44

Tabla 12. Comparación de los porcentajes de micronúcleos en tratamientos de exposición, recuperación, exposición versus recuperación y órgano-parámetro, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.

45

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo tecnológico, el crecimiento demográfico, la industrialización y el uso de nuevos métodos en la agricultura tecnificada, son factores que contribuyen a una continua incorporación al ambiente de grandes concentraciones y diversas sustancias sintéticas como naturales, cuyas interacciones y efectos adversos sobre el ambiente en los seres vivos no se conocen y la información que se tiene es insuficiente (Albert, 1988). Surgiendo la necesidad de valorizar el riesgo y caracterizar las situaciones en que se encuentra implícito, para plantear medidas de evaluación que permitan evidenciar la magnitud de tal riesgo (Wilson y Crouch, 1987).

Las sustancias sintetizadas por el hombre han aumentado de una manera casi exponencial, la Agencia para la Protección del Ambiente (EPA), en los Estados Unidos y la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1980, reportan que el número de sustancias de uso cotidiano, fue de 63,000. De ellas 1,500 son principios activos de plaguicidas, 4,000 son fármacos, 10,000 se emplean para fabricar cosméticos y otras 10,000 son utilizadas en la elaboración de productos domésticos (Albert, 1988).

También el desarrollo de biopesticidas es objeto de una ardua investigación científica, ya que se ha observado un incremento en el número de insectos que se convierten en plagas, resistentes a insecticidas sintéticos en muchas partes del mundo, además representan una oportunidad comercial para la producción de insecticidas específicos con bajos costos de producción y con una alta compatibilidad ambiental. Tal es el caso de la utilización del *Bacillus thuringiensis*, que durante las tres últimas

décadas ha sido empleado para el control de plagas en etapas larvarias para cultivos agrícolas y control de vectores de enfermedades tropicales.

Si bien las investigaciones en *B. thurginiensis*, se han enfocado en la estructura molecular de la toxina proteínica, también deben hacerse estudios de los efectos en los organismos que no son el blanco de acción, así como sus posibles implicaciones ecológicas por el uso de tal biopesticida (Lambert *et al.*, 1992).

A inicio de 1940 se advierte la posibilidad de efectos adversos de compuestos químicos (pesticidas) en organismos de los ambientes acuáticos, por lo que se inician los primeros estudios toxicológicos en peces, además de ser considerados los mejores indicadores de contaminación por pesticidas, debido a que los residuos de contaminantes son acumulados en los tejidos (Younos *et al.*, 1988).

Desde entonces, el daño ocasionado en la sobrevivencia de organismos de ríos ya se tiene documentado, por lo que surge la necesidad de establecer medidas preventivas para estimar daños antes de que estos ocurran (Buikema *et al.*, 1982). En un intento por estimar el grado de daño ocasionado, se desarrollaron las pruebas de toxicidad aguda, que se convierte en la herramienta básica para el monitoreo de los efectos de contaminantes en ambientes acuáticos (Albert, 1988).

La información generada de las pruebas de toxicidad pueden utilizarse para el manejo de los contaminantes ambientales en: (a) predicción de los efectos ambientales por los contaminantes; (b) comparaciones de sensibilidad a toxicidad entre organismos de prueba, tóxicos y condiciones de experimentación y (c) regulación de las descargas de contaminantes (Albert, 1988).

Por procesos de bioacumulación y bioamplificación, los pesticidas pueden persistir en diferentes niveles de las cadenas tróficas, llegando a alcanzar concentraciones letales o subletales, para algunos organismos o bien pueden llegar a los niveles superiores de la red trófica, en la que el hombre es un componente importante. La bioacumulación depende principalmente de la naturaleza química del compuesto, de la cantidad en que esté en contacto con el organismo y de las velocidades de absorción y excreción del tóxico por cada organismo (Alpuche, 1991).

Los primeros efectos provocados por la contaminación ocurren en los niveles inferiores de la organización biológica, después tales perturbaciones se manifiestan a nivel poblacional, comunidad y en diferentes niveles del ecosistema. Los efectos subletales primeramente son expresados por alteraciones a nivel bioquímico y molecular, tales pueden ser a nivel de la membrana celular y en el material genético, induciendo una serie de respuestas estructurales y funcionales como la regulación hormonal, metabolismo, inmunológica y osmorregulación. Tales efectos pueden afectar a los organismos a nivel sobrevivencia, crecimiento o reproducción y finalmente provocar efectos en detrimento de la población, comunidad y a nivel de ecosistema (Adams *et al.*, 1990).

Con la utilización de bioindicadores es posible realizar mediciones por exposición a contaminantes y evaluar efectos sobre enzimas involucradas en los procesos de desintoxicación, daño en el DNA, cromosomas o núcleos, disfunción de órganos, histopatologías, estado nutricional, funciones bioenergéticas y otras variables indicadoras de salud (Bevelhimer, 1991).

Estas metodologías han sido usadas exitosamente en ríos contaminados, donde los organismos bioindicadores corresponden a gradientes de contaminación, en relación gradual al origen o fuente de contaminación (Albert,1988).

La utilización de peces como bioindicadores constituye una herramienta valiosa para el monitoreo de la contaminación ambiental, para la recuperación de poblaciones, así como para establecer medidas de remediación en los sistemas contaminados (Fox, 1994).

II. ANTECEDENTES

El acelerado desarrollo industrial ha provocado la presencia de agentes, que por sus características o por su alta concentración, son dañinos tanto para los organismos como para los ambientes en donde aquellos se desarrollan. Estos agentes nocivos provocan alteraciones en la estructura y función de los organismos expuestos, las cuales se aprecian como enfermedades, incapacidades, muertes y hasta desaparición de especies animales y vegetales, así como el desequilibrio de la dinámica natural de los ecosistemas, que propicia, en última instancia, la desaparición de los mismos.

El humano se ha valido de la Toxicología para generar conocimientos que definan cuánto es lo mínimo aceptable de las sustancias a las que con relativa frecuencia se expone el ser humano. Además, avanza en la comprensión de los mecanismos fisiológicos, celulares y moleculares que determinan la toxicidad. Este tipo de conocimiento permite sugerir la prohibición o disminución en el uso o la producción de ciertas sustancias, el control de aquellas con un bajo riesgo, así como determinar el posible papel de éstos tóxicos en el desarrollo de enfermedades crónicas, degenerativas y de respuestas mutagénicas, carcinogénicas y teratogénicas (Vega y Reynaga, 1991).

En los Estados Unidos, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) ha estimado que el 72% de todas sus cuencas están contaminadas por desechos industriales. Muchos de los cuales poseen características carcinogénicas (Krayball, 1977). Este problema no es exclusivo de los Estados Unidos ya que está bastante documentado que sustancias como pesticidas, bifenilos policlorinados e hidrocarburos aromáticos policíclicos se encuentran en altas concentraciones en muchos sistemas acuáticos del mundo, así como

en los animales que habitan tales aguas. Los posibles riesgos para la salud pública que esto implica aún son desconocidas (Krayball, 1977).

En un intento por determinar los efectos de los xenobióticos sobre la estructura y función de los sistemas acuáticos han surgido nuevas líneas de investigación científica como la Toxicología acuática y Genética toxicológica. Éstas generalmente utilizan peces como organismos de prueba, ya que económica y ecológicamente son fundamentales en los sistemas acuáticos, además de que son bastante sensibles a las condiciones ambientales adversas y pueden estudiarse relativamente fácil en condiciones de laboratorio (Kligerman, 1980).

Los bioensayos de toxicidad son una herramienta que puede ser usada para evaluar el riesgo de los xenobióticos, obteniéndose una respuesta global de tal sustancia disuelta en efluentes de descarga industriales y domésticas (Gaete *et al.*, 2000).

La Genética Toxicológica ha tenido un crecimiento exponencial, principalmente los estudios relacionados con el cáncer causado por mutación somática experimental. También ha avanzado debido al conocimiento de los problemas causados por contaminación ambiental y apoyado con el desarrollo de nuevas técnicas para el estudio de los efectos de sustancias genotóxicas, interactuantes con el ADN y efectos como la carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis (Ames *et al.*, 1973; Miller y Miller, 1975; McCann *et al.*; 1975).

La mayor parte de los estudios genéticos en peces son relativos a la descripción del cariotipo, citotaxonómicos, así como a la caracterización de genes y mapeo genético (Kligerman, 1980).

Tsoi (1970; 1971) fue el primero en investigar los efectos de mutágenos en el material genético, utilizando dimetil sulfato, úrea nitrosometil, úrea nitrosoetil y 4-bisdiazoacetil butano, para inducir ginogénesis entre diferentes especies de peces; reportando anomalías en los cromosomas de gástrulas en desarrollo después de la exposición química. Tales efectos pueden ser: fragmentación de cromosomas, mitosis con polos múltiples además de puentes anafásicos y telofásicos.

En un estudio pionero para analizar daño cromosómico en peces de ambientes contaminados, Longwell (1976) reporta en macarela (*Scombrus scombrus*) recolectados de aguas superficiales en la bahía de Nueva York, puentes cromosómicos, aglutinamiento cromosómico y husos con orientación anormal.

Kligerman (1979; 1980) señala que anteriormente en el campo de la Genética Toxicológica de ambientes acuáticos, la mayoría de las metodologías eran inapropiadas, las especies indicadoras de contaminación no eran las más adecuadas para los diseños experimentales, además que carecer de una curva de respuesta para dosis letales. Debido a lo anterior, cabe la posibilidad de que los daños observados se debieran a metodologías inadecuadas.

La Genética toxicológica se puede aplicar bajo dos consideraciones, en (1) protocolos a largo plazo basados en estudios epidemiológicos, ensayos de carcinogénesis y mutagénesis en laboratorio; y (2) protocolos a corto plazo usando dominantes letales, locus específicos y ensayos citogenéticos.

En teoría las investigaciones epidemiológicas ofrecen las evidencias más confiables y evidentes para determinar los agentes carcinogénicos en los sistemas

acuáticos. Sin embargo, en la práctica los estudios epidemiológicos son difíciles de realizar y en ocasiones arrojan resultados incorrectos (Kligerman, 1980).

Brown *et al.* (1973 y 1979) estudió cuencas hidrológicas clasificándolas como: alta, mediana y libres de contaminación, encontrando una relación directa con el nivel de contaminación y el porcentaje de peces con enfermedades.

Los virus y factores parasitarios pueden confundir el problema y dificultar los controles en la investigación. Por esto, aunque los estudios epidemiológicos pueden advertir significativamente el deterioro ambiental, no parece ser lo más apropiado o sensitivo para monitorear los ambientes acuáticos para la presencia de sustancias químicas genotóxicas.

Los primeros ensayos carcinogénicos fueron iniciados por Stanton (1965), quien demostró la utilidad del uso de pequeños acuarios para estudios carcinogénicos en peces; indujo a la formación de hepatomas y colanginomas en el pez zebra (*Brachydanio rerio*) por exposición a dietilnitrosamina. Subsecuentemente Matsushima y Sugimura (1976), demostraron la alta sensibilidad para la inducción de tumores por diferentes carcinógenos tales como benzo(a)pireno, dimetilnitrosamina y o-aminoazotolueno. Además de evidenciar sensibilidad, estos estudios presentan otras ventajas tales como detección de resistencia de peces a los efectos de las sustancias genotóxicas, determinación del tiempo de inducción de los tumores carcinogénicos y el poder mantener gran cantidad de organismos en condiciones controladas de laboratorio.

Existen otros métodos para detectar los carcinógenos ambientales, tales como los cromatográficos que pueden determinar el tipo y concentración de sustancias químicas

presentes en las muestras de agua, por lo que el potencial carcinogénico puede ser probado individualmente o en mezclas específicas, otro método alternativo puede ser la utilización de ósmosis inversa para concentrar los compuestos orgánicos de la muestra de agua y estos concentrados probarlos directamente (Kopfler *et. al.*, 1974).

Las ventajas de los sistemas experimentales para carcinógenos comparados con los epidemiológicos, es que son más sensibles ya que se excluye la presencia de activadores de factores endógenos, y las condiciones del ambiente pueden ser rigurosamente controladas. La mayor desventaja es el tiempo requerido, ya que se necesita de seis meses a un año para determinar el poder carcinógeno de una o mezcla de sustancia(s) química(s) (Heddle, 1989).

Los estudios citogenéticos en cambio son los más sensitivos y eficientes para detectar los efectos de los genotóxicos, debido a que los otros métodos a corto plazo (letales dominantes y locus específicos) resultan ser sólo valiosos para estudios básicos relacionados con el metabolismo, iniciación y promoción neoplásica, así como mecanismos de interacción, entre el genoma y sustancias químicas. Los estudios citogenéticos tienen como ventajas, el requerir pequeños tamaños de muestra y pueden efectuarse bajo controles de laboratorio muy rigurosos y en períodos cortos de tiempo; en estos estudios se pone de manifiesto la interacción directa de los genotóxicos con el genoma completo, y no sólo en uno o dos loci específicos (Kligerman, 1980).

Un esquema recomendado para estudios citogenéticos es el siguiente: 1. Seleccionar especies de peces indicadoras con las siguientes características: deben obtenerse fácilmente, de preferencia con una alta densidad poblacional, poseer un

número cromosómico pequeño y que de preferencia posean cromosomas con un tamaño mayor de 25 μ m. 2. Exponerlo en “encierros” en el sistema acuático o en condiciones de laboratorio, a sustancias químicas, concentrados de muestra de agua u otros agentes ambientales. 3. Remover y estimular la mitosis de tejidos activos para obtener cultivos celulares (e.g. células de sanguíneas) para cuantificar calidad y frecuencias de células en metafase, donde se evalúa el daño genético. 4. Finalmente, comparar los grupos experimentales con los controles (Kligerman, 1980).

Todos los pesticidas son potencialmente tóxicos para los humanos y otros organismos. El grado de daño ocasionado depende de las características del pesticida, la cantidad o dosis y la duración de exposición o tiempo en contacto (Younos *et al.*, 1988).

La toxicología acuática ha desarrollado metodologías para la valoración de los efectos de toxicidad por exposición a una dosis durante un período de tiempo dado. Tales valoraciones de riesgo se basan en estudios de dosis-respuesta, siendo realizados en condiciones de laboratorio, ecosistemas naturales y mesocosmos (estanques experimentales y encierros *in situ*) (Younos *et al.*, 1988).

Existen dos categorías de pruebas toxicológicas para determinar los efectos tóxicos de los pesticidas, en mamíferos, como los determinados en conejos, ratas y perros, así como los efectos tóxicos estimados en organismos acuáticos como peces e invertebrados (Younos *et al.*, 1988).

Las pruebas de toxicidad en mamíferos y organismos acuáticos proveen de información para evaluar daños y valorizar el riesgo asociado con el uso de pesticidas. Los estudios de toxicidad comprenden determinaciones de efectos agudos, subcrónicos,

crónicos, mutagénesis y algunos parámetros especiales. Las valoraciones de toxicidad aguda generalmente son a corto plazo, una de las más utilizadas es la determinación de la dosis letal (LD_{50}), que representa la media de la dosis requerida de la sustancia en estudio para aniquilar al 50% de la población de organismos en experimentación. La LD_{50} se expresa en mg/kg del peso del animal en estudio. La LC_{50} representa el valor medio de concentración química en el agua requerido para aniquilar el 50% de la población. La LC_{50} se expresa en mg/l litro de solución acuosa. Existe también una valoración denominada dosis máxima tolerada (MTD), que representa la dosis de una sustancia dada que produce algún efecto tóxico o farmacológico específico (Younos *et al.*, 1988).

La dosis más baja utilizada de una sustancia que no produce un efecto tóxico evidente se conoce como nivel de efectos no observados (NOEL). En la práctica de esta determinación ha surgido un criterio, el utilizar un factor de seguridad de 100 para lo determinado en los organismos de prueba, como la dosis que puede ser consumida por humanos sin representar un riesgo, excepto para pesticidas carcinogénicos y mutagénicos. En éstos últimos se requiere de modelos matemáticos para estimar el riesgo y probabilidad de ocurrencia de tumores o mutación (Younos *et al.*, 1988).

Debido a la acumulación de sustancias contaminantes en el ambiente, aumenta la probabilidad de la exposición del humano a éstas durante algún período de su vida incluyendo la gestación. En vista de lo anterior, se han desarrollado métodos analíticos de alta sensibilidad para detectar y cuantificar la presencia en el ambiente de cantidades mínimas de sustancias potencialmente tóxicas. En las pruebas experimentales de

toxicidad, los efectos tóxicos o indeseables se detectan a dosis muy elevadas, por lo que es necesario determinar la probabilidad de que se obtengan respuestas similares para las concentraciones de exposición "normales", lo que se obtiene a partir de pruebas toxicológicas tales como la determinación de la concentración letal LC_{50} , entre otras.

Los datos obtenidos experimentalmente sirven para elaborar modelos matemáticos en donde se intenta predecir cómo responderían los animales de experimentación a concentraciones más bajas. Estos modelos no pueden predecir la respuesta en humanos; sin embargo, se hacen suposiciones teóricas con bases biológicas comparativas para poder extrapolar a los humanos los datos obtenidos en animales (Vega y Reynaga, 1991).

Para el caso de la presente investigación, los resultados obtenidos de toxicidad por LC_{50} tienen validez en la determinación de concentraciones de seguridad para la especie en estudio y para la predicción de efectos del contaminante en los sistemas acuáticos. De manera hipotética se pueden extrapolar los posibles efectos para la salud en humanos.

Las pruebas de mutagénesis comprenden la valoración de eventos como la mutación, aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales, daño en el DNA y reparación del mismo (Younos *et al*, 1988).

El daño inducido por diversos factores al material genético, a través de la mutagénesis, es uno de los riesgos toxicológicos que no ha sido valorado suficientemente a pesar de su repercusión en la salud de los individuos afectados y sus descendientes. Diversos estudios sugieren una relación de causa-efecto de la

mutagénesis con la transformación maligna de las células (carcinogénesis) y ciertas alteraciones del desarrollo (teratogénesis).

Por lo antes señalado se requiere del análisis de la relación entre el riesgo y beneficio que representa cada compuesto, para fundamentar la toma de decisiones sobre el control de su producción y consumo.

Las alteraciones intragénicas pueden producirse por sustitución de bases o por desfasamiento. La primera ocurre por una transición, reemplazo de una base por otra del mismo tipo, o por una transversión, en la que una base de un tipo es sustituida por otra de tipo diferente. El desfasamiento consiste en el corrimiento de la secuencia por eliminación o adición de bases. Las mutaciones pueden resultar de la acción directa de los agentes químicos sobre el material genético o sobre otros componentes celulares funcionalmente ligados a él, como los que participan en la división celular (centriolos y microtúbulos), las proteínas de la cromatina y las enzimas que contribuyen a su replicación o reparación.

La coincidencia de resultados en varios sistemas, que incluya algunos funcionalmente semejantes al humano, constituye un elemento de gran utilidad para normar criterios sobre el uso o difusión de las sustancias, aun cuando no permita predecir el riesgo con precisión (Cortinas de Nava, 1990).

II.2 REQUERIMIENTOS MEDIO AMBIENTALES PARA EL CULTIVO DE TILAPIA

Cada organismo requiere de condiciones físicas y químicas adecuadas para su mejor desarrollo. Según la Secretaría de pesca (1994), los valores óptimos y tolerables para el cultivo de tilapia son:

Temperatura: Es uno de los factores limitantes para el cultivo de estas especies, por ser de origen tropical, el intervalo óptimo oscila entre los 20 y 30 °C y aunque pueden soportar temperaturas alrededor de los 15 °C, sus funciones fisiológicas se alteran. La reproducción se efectúa a temperatura superior a los 20 °C (el intervalo óptimo es de 26 a 29 °C). Los límites superiores de tolerancia varían entre los 37 y 42 °C.

Salinidad: Las tilapias dulceacuícolas evolucionaron a partir de un antecesor marino, por lo cual se adaptan a vivir en aguas saladas. Incluso *O. mossambicus* y *T. zillii* se puede reproducir en el mar, sin embargo, esta tolerancia se ve influenciada por la temperatura. Las tilapias que soportan amplios intervalos de concentraciones de sal (eurihalinas) crecen más rápido a niveles cercanos a la isotonia, ya que reducen el gasto de energía para el control osmótico de sus fluidos corporales, lo cual permite cultivar estas especies en zonas no aptas para la agricultura o ganadería, como son los embalses de agua marina o salobre.

Oxígeno disuelto: Otra ventaja al cultivar estas especies, es su total tolerancia a bajas concentraciones de oxígeno disuelto, pues aunque su presión parcial sea baja, su sangre es capaz de saturarse de oxígeno y aún de reducir su consumo si la concentración es

inferior a 3 mg/l usando un metabolismo semianaeróbico, con el cual soporta niveles de 1 mg/l e incluso menor por períodos cortos. En esta última condición, disminuye además el consumo de alimento y por lo tanto retarda su crecimiento. Por ello, no es aconsejable permitir un abatimiento de oxígeno por debajo de 2 ó 3 mg/l, lo cual puede suceder en días sombreados o en ausencia de luz solar, pues inclusive la baja concentración de oxígeno conduce a la aparición de enfermedades.

pH: Los cambios de pH tienen efectos indirectos sobre la tilapia, pues como es herbívora, la variación en este parámetro perjudica fuertemente la productividad de natural del estanque y mientras más estable permanezca el pH del sistema de cultivo (7 a 8) existirá una fuente alimenticia de mejor calidad y cantidad. No es recomendable la cría de tilapia en aguas ácidas o que estén en contacto con suelos ácidos.

Alcalinidad y dureza: La variación en éstos parámetros, al igual que el pH, influye sobre la cantidad de alimento disponible para la tilapia y no directamente sobre ésta, por lo cual se recomienda una alcalinidad superior a 175 mg/l de carbonato de calcio (CaCO_3), pues afecta la productividad del estanque y a las branquias de las tilapias. El nivel óptimo de alcalinidad es de 20 mg/l de carbonato de calcio; los niveles inferiores a 5 mg/l inhiben el desarrollo de las plantas acuáticas. Cuando las concentraciones de carbonato de calcio son elevadas, se produce una excesiva presión osmótica asfixiando a los organismos y bloqueando el mecanismo liberador de sal y cloro.

Turbidez: Este fenómeno es provocado por partículas sólidas que forman suspensiones coloidales en el agua. El efecto primario que ocasionan las partículas en suspensión es

sobre las branquias, causando lesiones que son puerta de entrada a infecciones por patógenos. Además, impide la libre penetración de la luz solar en el agua por lo que se reduce la productividad natural (fitoplancton) del estanque y por lo tanto, del alimento disponible para las tilapias. La recomendación conveniente al respecto es no permitir niveles críticos de turbidez, sedimentando por medios físicos y/o químicos las partículas del estanque cuando los niveles son superiores a 100 mg/l.

Sustancias tóxicas: Las tilapias, a diferencia de otros peces, son tolerantes a diversas sustancias tóxicas, entre estas se encuentran los desechos metabólicos excretados por los mismos peces (tales como el amoníaco), sobresaturación de gases (oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono y ácido sulfhídrico), toxinas producidas por el fitoplancton o por otras plantas terrestres (Acacias), anoxias causadas por el exceso de fitoplancton, aflatoxinas de hongos contenidos en el alimento, materiales pesados, pesticidas, fertilizantes, detergentes y pinturas. Pero a pesar de estas ventajas, el óptimo desarrollo y factor de conversión alimento-peso requiere de aguas de buena calidad.

Enfermedades presentes en cultivos: En cultivos intensivos, las tilapias adquieren enfermedades de dos tipos: por agentes patógenos y por carencias nutricionales. Las primeras pueden ser provocadas tanto por una alta densidad de peces como debido a la degradación del estanque. Una vez establecida la enfermedad es conveniente curarlos a pesar de las numerosas dificultades que esto representa (Morales *et al.*, 1988; Morales, 1991). El uso indiscriminado de antibióticos en el cultivo de la tilapia, al igual que en el de otras especies, ha sido motivo de controversias en cuanto a consideraciones médicas y veterinarias. Clínicamente está justificado el uso de oxitetraciclina y sulfonamidas

usadas a nivel terapéutico, pero no indiscriminadamente como medida profiláctica debido al riesgo que representa para el humano la resistencia de los patógenos a los antibióticos (Jiménez-Guzmán *et al.*, 1988).

II.3 ¿PORQUÉ ESTUDIAR LOS EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS PESTICIDAS?

A la fecha, el uso de plaguicidas constituye una práctica aparentemente necesaria dada la creciente demanda de alimentos y ante la amenaza que representan las más de 20,000 plagas de insectos, hongos, malezas, nemátodos, bacterias y virus que atacan constantemente a los cultivos y generan la pérdida de alrededor del 30-40% de las cosechas mundiales (Gómez-Arroyo *et al.*, 1992; Melo-Manzur, 1993).

El uso masivo e indiscriminado de plaguicidas ha generado problemas adicionales a aquellos relacionados con la salud de los seres vivos y de la contaminación de los ecosistemas. Actualmente existen más de 600 plagas resistentes a los plaguicidas (Restrepo, 1988). Grandes extensiones de tierras, tanto en México como en otros países, se han vuelto improductivas y en ello ha influido la enorme cantidad de plaguicidas vertidos en el ambiente que además de combatir plagas eliminan organismos benéficos, incluyendo aquellos involucrados en la degradación de la materia orgánica y aireación del suelo (Restrepo, 1988).

Se calcula que en México se comercializan al menos seis de los pesticidas prohibidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y son utilizados más de una docena de pesticidas que han sido declarados como altamente riesgosos para la salud humana y el ambiente por la "Pesticide Action Network International". Las

consecuencias más palpables del uso y abuso de los agroquímicos se han manifestado a través de envenenamientos masivos producidos por el uso de pesticidas extremadamente tóxicos, como los ocurridos en México por el pariatión en 1968; en Córdoba, Veracruz en 1991 y recientemente en los Mochis, Sinaloa en 1993 (Bojórquez, 1994).

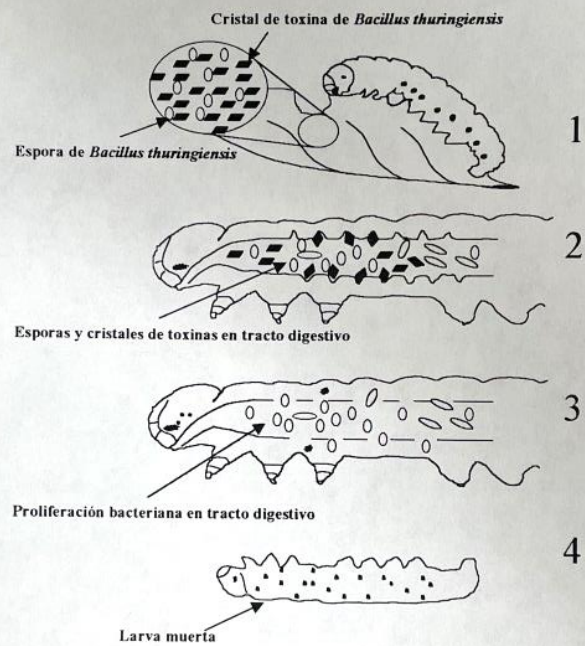
Baja California se ha caracterizado por la alta productividad agrícola de algunos de sus valles, como los de Mexicali, que en su momento fue el mayor productor de algodón a nivel nacional.

Entre las principales zonas agrícolas de la costa de Baja California se encuentran el Valle de Guadalupe, Valle de Maneadero que ha mantenido la producción de una gran variedad de hortalizas y los valles de Camalú y San Quintín, donde se producen anualmente grandes cantidades de tomate. A menor escala, sin que su productividad deje de ser significativa, se encuentran el Ejido Uruapan, Eréndira, Colonet, Colonia Vicente Guerrero y San Telmo, donde se producen cereales como el trigo, cebada, avena y hortalizas entre los que destacan: tomate, repollo, chícharo, chile, pepino, col; frutas como sandía, melón, fresa y diversas variedades de flores y semillas.

De acuerdo a información obtenida en S.A.R.H. en la zona costera se utilizó cerca de un millón de kilogramos de pesticidas en 1991. Esta cantidad se considera subestimada ya que dichas estimaciones están basadas en los pesticidas más utilizados, ya que el total es difícilmente cuantificable. El número de pesticidas tampoco puede ser cuantificado con exactitud, sin embargo, cálculos basados en información proporcionada por dependencias oficiales, distribuidores y agricultores, indican la utilización de 85 principios activos que se comercializan en más de 150 plaguicidas diferentes. De éstos el 46 % son insecticidas, el 33 % fungicidas y el 21 % restante comprenden herbicidas,

nemáticas y rodenticidas. Cabe señalar que aunque los nemáticas comprenden solo el 5% compiten tanto en cantidad como en toxicidad con los primeros (Bojórquez, 1994).

II.4 Mecanismo de acción de productos formulados con *Bacillus thuringiensis*



- 1) El gusano barrenador consume follaje tratado con *Bacillus thuringiensis*.
- 2) En unos minutos la toxina se une a receptores específicos en la pared del tracto digestivo, por lo cual el gusano deja de alimentarse.
- 3) En unas horas la pared del tracto digestivo se rompe, permitiendo la entrada de esporas y proliferación bacteriana a la cavidad del cuerpo, donde la toxina se disuelve.
- 4) En uno o dos días el gusano muere de septicemia, esporas y bacterias proliferan.

Figura 1. Acción de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en gusano barrenador.

El efecto tóxico de *Bacillus thuringiensis* se fundamenta en la formación de esporas, las que contienen cristales de toxinas proteicas con potencial insecticida. Una vez ingerida por los insectos, la toxina se une a las células epiteliales del tracto digestivo, rompiéndolas, por lo que la larva deja de comer y muere por inanición.

HIPÓTESIS

El daño genético en la tilapia, *Oreochromis aureus*, se incrementa en función del tiempo de exposición y la concentración de una sustancia potencialmente genotóxica.

IV. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el daño genotóxico en la tilapia, *Oreochromis aureus*, por exposición *in vivo* al insecticida *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*, mediante el análisis de cromosomas y núcleos interfásicos en individuos provenientes de la presa Emilio López Zamora, Ensenada, Baja California, México.

V. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- a) Evaluar el efecto genotóxico de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* en la tilapia *Oreochromis aureus*.
- b) Determinar la concentración letal LC_{50} del pesticida *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* en el pez *Oreochromis aureus*.
- c) Cuantificar el daño genético y establecer correlaciones entre daño y concentración del pesticida.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 SELECCIÓN DE LA ESPECIE.

La especie a utilizar se seleccionó a partir de una revisión bibliográfica sobre la distribución de peces en aguas continentales en la península de Baja California. Se encontró que *O. aureus* es la especie más recientemente introducida en la región. También se consideraron aspectos biológicos tales como: distribución geográfica, reproducción, importancia ecológica, importancia comercial, facilidad en recolección, transporte, manejo y mantenimiento en condiciones de laboratorio, entre otros.

VI.2 UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.

El cultivo comercial de tilapia se ubica al este de la ciudad de Ensenada, en la Presa Emilio López Zamora (Fig. 2), la cual tiene una capacidad de 3 millones de metros cúbicos. Es alimentada por el arroyo Valle Verde, que pertenece a la cuenca hidrográfica del Arroyo-Ensenada, que a su vez es alimentada por la precipitación pluvial durante los meses de invierno. La construcción de la presa fue iniciado en 1973, con el propósito de controlar avenidas. La calidad del agua es considerada como aceptable (INEGI, 1995). La importancia ecológica de la Presa Emilio López Zamora es que constituye el único cuerpo de agua perenne (potable) de la ciudad de Ensenada, además, mantiene por lo menos dos especies de peces introducidas, lobina negra (*Micropterus salmoides*) y la mojarra agalla azul (*Lepomis macrochirus*) (Ruiz-Campos *et al.*, 2000). También es una zona de descanso para aves (Programa de Desarrollo de la Ciudad de Ensenada, Gobierno del Estado de Baja California, 1995).



Figura 2. Ubicación de la presa Emilio López Zamora

Son dos las especies cultivadas en esta presa: la tilapia *Oreochromis aureus* y el bagre *Ictalurus punctatus*. Éstos se encuentran dentro de un sistema flotante formado por 10 jaulas con una dimensión aproximada de 1.5 m X 1.5 m X 2m; forradas con red de malla de 1/4 de pulgada. Cada jaula mantiene una densidad de 200-300 organismos. Los peces cultivados se alimentan tres veces al día, con alimento comercial, conocido como bagrina de fabricación nacional. La primera introducción de 10,000 alevines de tilapia a las jaulas se efectuó el 25 Mayo de 1995, procedente del Centro Acuícola “La Esperanza” de la Secretaría de Pesca del Estado de Sonora. El bagre se introdujo en Julio de 1995, procedente del Rancho Mosqueda, una granja productora de bagre y tilapia ubicada en el valle de Mexicali, B. C. Cabe mencionar que este cultivo es un

proyecto experimental de producción masiva (Raúl Cortez, 1995 comunicación personal, propietario del cultivo).

VI.3 CONDICIONES DE MANEJO DE LOS ORGANISMOS EN EL LABORATORIO.

La tilapia, *Oreochromis aureus*, fue identificada taxonómicamente en el Laboratorio de Vertebrados de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California, basado en la clasificación taxonómica de Barret (1983). Se recolectaron 50 organismos, que fueron colocados en un estanque de 500 litros con filtro biológico de grava arena y concha de ostión fragmentada. El agua utilizada se obtuvo de la red de agua pública municipal, ésta es la utilizada en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California. Los peces estuvieron por un período de 45 días en el estanque, con el fin de que se aclimataran al laboratorio. Durante éste período se les alimentó con alimento comercial para peces, dos veces al día. También se realizaron recambios del volumen total de agua del estanque cada tres días y se extrajeron con un sifón las excretas del agua utilizando para ello una manguera de plástico, con el objeto de mantener en óptimas condiciones el agua del estanque de aclimatación.

VI.4 DETERMINACIÓN DE CL_{50} Y EVALUACIÓN DE DAÑO GENÉTICO

La etapa experimental consistió de dos fases (I y II), las cuales se ilustran en la figura 3.

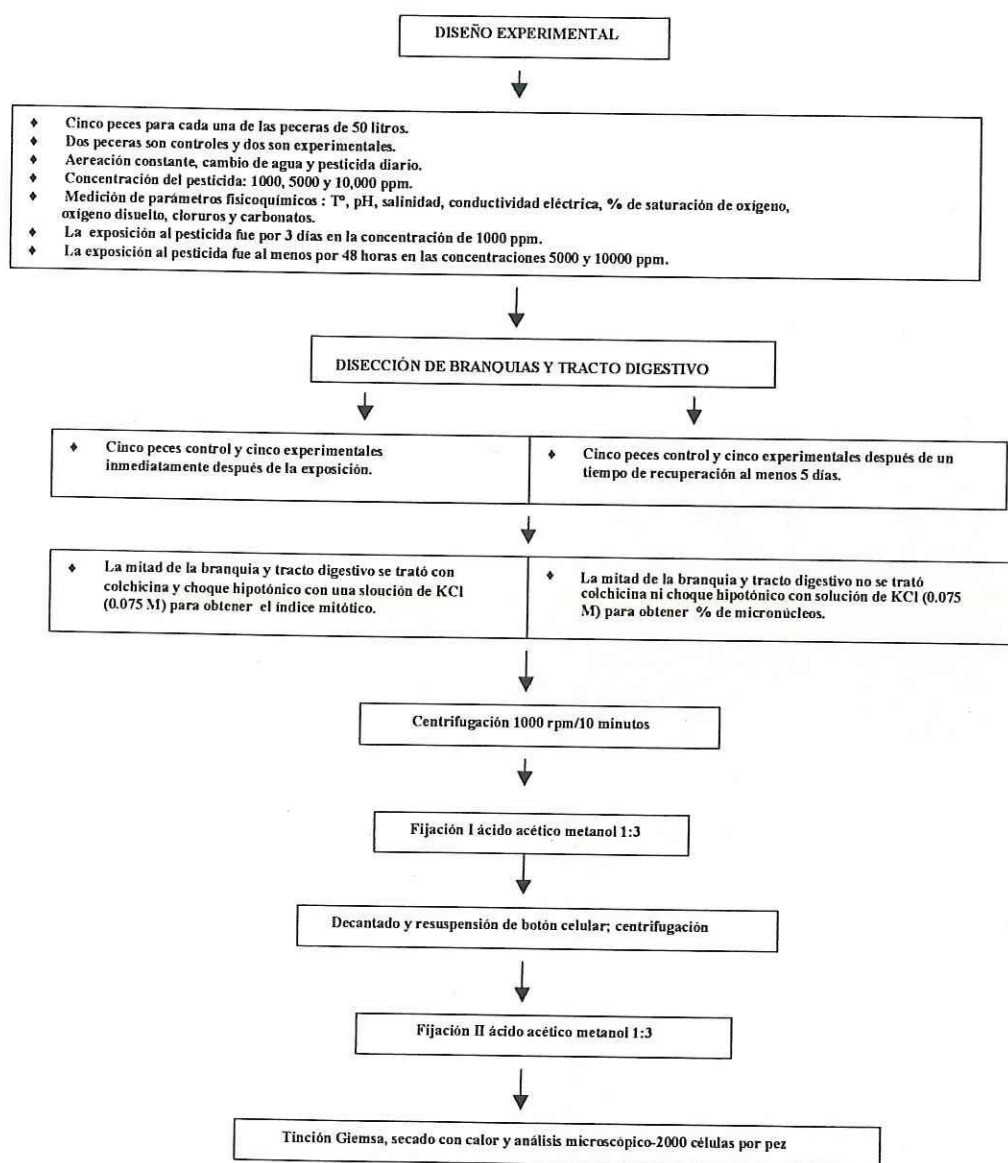


Figura 3. Diagrama de flujo del diseño experimental.

A) FASE I

La determinación de la concentración letal (Cl_{50}) consiste en establecer la concentración de una sustancia dada a la cual muere la mitad de los individuos en un diseño experimental. Generalmente este parámetro está dado a las 48 horas de exposición a tal sustancia.

Para la realización de los experimentos de Cl_{50} se utilizaron 3 acuarios provistos con aireación constante y dentro de cada uno se colocaron 10 organismos. En la fase I, se probó una concentración de 1000 ppm del biopesticida *Bacillus thuringiensis* var. *Aizawai*, cuya presentación en polvo es conocida comercialmente como Agree y es elaborado por Ciba-Geigy de México.

El experimento inició en Febrero de 1997 y terminó en Marzo del mismo año. La solución de prueba se cambió cada 24 horas con el objeto de que la concentración del tóxico fuese constante. En el acuario utilizado como testigo se utilizó solamente agua potable.

En el experimento I el tiempo de exposición sólo fue por tres días (72 horas) que es tiempo suficiente para determinar la Cl_{50} y se tomaron datos a 1, 2, 3, 4, 5, 12, 24, 36, 48 y 72 horas. No obstante se continuó con las evaluaciones hasta los 16 días. Los datos registrados fueron: nado errático, nado hacía la superficie, hacinamiento, sobrevivencia y muerte.

Durante el corrimiento del experimento se realizó la medición de parámetros fisicoquímicos del agua utilizada en las peceras tanto en las experimentales como en los testigos. Los parámetros fisicoquímicos fueron: temperatura, salinidad, pH,

conductividad eléctrica, porcentaje de saturación de oxígeno, oxígeno disuelto, cloruros y carbonatos.

Inmediatamente después del tiempo de exposición al biopesticida, se disecaron las branquias y tracto digestivo de los peces muertos, con el propósito de obtener células epiteliales y evaluar el daño genético. Se aplicó el mismo procedimiento a los organismos usados como testigos que no fueron expuestos al biopesticida. Este grupo de organismos fue sacrificado por medio de una punción cerebral, previo a la disección.

Después del periodo de exposición, a los peces sobrevivientes se les hizo un recambio de agua y se les alimentó con comida comercial para peces, con el objeto de observar la conducta ante el alimento. Se dejó transcurrir un período de recuperación de 15 días con agua libre del biopesticida con el propósito de permitir que las células de los tejidos de los peces repitieran varias veces su ciclo celular; de tal manera que se pudiera evidenciar si ocurrió algún daño genético manifestado como micronúcleos en las células interfásicas.

Una vez disecadas las branquias y tracto digestivo de los organismos experimentales y testigos, se colocaron en una caja petri donde se seccionó cada órgano en partes iguales y enseguida se hizo un raspado celular usando un bisturí y agujas de disección.

A la mitad del raspado epitelial de cada órgano se le aplicó un tratamiento con colchicina al 1% por lo menos 1 hora, enseguida se agregó una solución de KCl (0.075M) incubándose por 30 minutos a 37° C; lo que permitió obtener células en metafase para determinar el índice mitótico celular. La otra mitad de la muestra no fue tratada con colchicina, ni con KCl (0.075M), lo cual permitió evaluar el porcentaje de

micronúcleos. Posteriormente las muestras se traspasaron a tubos de ensaye y se centrifugaron a 1000 rpm por diez minutos.

Una vez centrifugada la muestra, se le agregó el fijador (ácido acético-metanol 1:3). De nuevo se centrifugaron a 1,000 rpm por diez minutos. Enseguida a los tubos se les decantó el líquido sobrenadante, se agregó de nuevo fijador (ácido acético-metanol 1:3) para resuspender el botón celular y nuevamente se centrifugaron a 1000 rpm por diez minutos hasta que el botón celular se tornó blanquecino. Cada una de los tubos se rotularon debidamente, con su clave experimental, se colocaron en gradilla y se almacenaron en refrigeración a 10° C.

Para el análisis de daño genético en núcleos interfásicos se utilizó el material precipitado contenido en el botón celular, con el cual se hicieron preparaciones por goteo y fijado a la flama. Enseguida se tiñeron con colorante Giemsa al 2% preparado con solución amortiguadora de Sorensen y agua destilada en una proporción 1:2:45

El análisis microscópico consistió en la revisión de 2,000 células por órgano y por parámetro, tales como la determinación de micronúcleos y el índice mitótico para cada pez. Las laminillas fijadas se examinaron bajo el microscopio óptico para efectuar los conteos de frecuencia de micronúcleos, células en metafase así como otros parámetros indicadores de daño genético entre los que se encuentran apoptosis, cariorexis, heteropicnosis.

B) FASE II

En la FASE II se realizaron los mismos procedimientos que en la FASE I, con la diferencia de que se probaron dos concentraciones: 5,00 y 10,000 ppm. Tal experimento

se realizó el 16 de Octubre de 1997. No fue necesario hacer un recambio del biopesticida en las peceras, puesto que en menos de 48 horas se obtuvo la CL_{50} para las dos concentraciones de prueba.

VI.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis a un nivel de significancia del 5% (Mason y Lind, 1993). Las hipótesis estadísticas fueron: H_0 : todas las concentraciones a las que se expusieron los peces provocan el mismo daño genético. H_a : al menos uno de los tratamientos experimentales fue diferente.

VII. RESULTADOS

A) CONCENTRACIÓN LETAL 50 (CL₅₀)

Los resultados obtenidos de concentración letal 50 (CL₅₀) se observan en la figura 4. Para la concentración de 1,000 ppm en una de la réplica expuestas solamente uno de los peces en el lote control, murió aproximadamente a las 190 horas de exposición. En la otra réplica control se tiene que ninguno de los peces murió.

Para la concentración de 1,000 ppm en uno de los lotes experimentales se observa que para las 48 horas no se obtiene una disminución notable en la población experimental, por lo tanto no resulta una concentración letal a las 48 horas, pero bien por los efectos observados en cuanto a la conducta de los peces después del tiempo de recuperación, bien se pudiera considerar como una concentración subletal para éstos organismos, puesto que sí existe una caída poblacional en la gráfica de sobrevivencia que se observa claramente por la muerte de organismos a las 115, 130, 175 y 188 horas. Para ésta misma concentración en otro lote experimental, se observa algo similar, la muerte de los organismos es a las 132, 288 y 385 horas.

Para la concentración de 5,000 ppm se observa que antes de las 48 horas de exposición se muere la mitad de la población experimental, por lo tanto resulta una concentración letal. Igual ocurre para la concentración de 10,000 ppm.

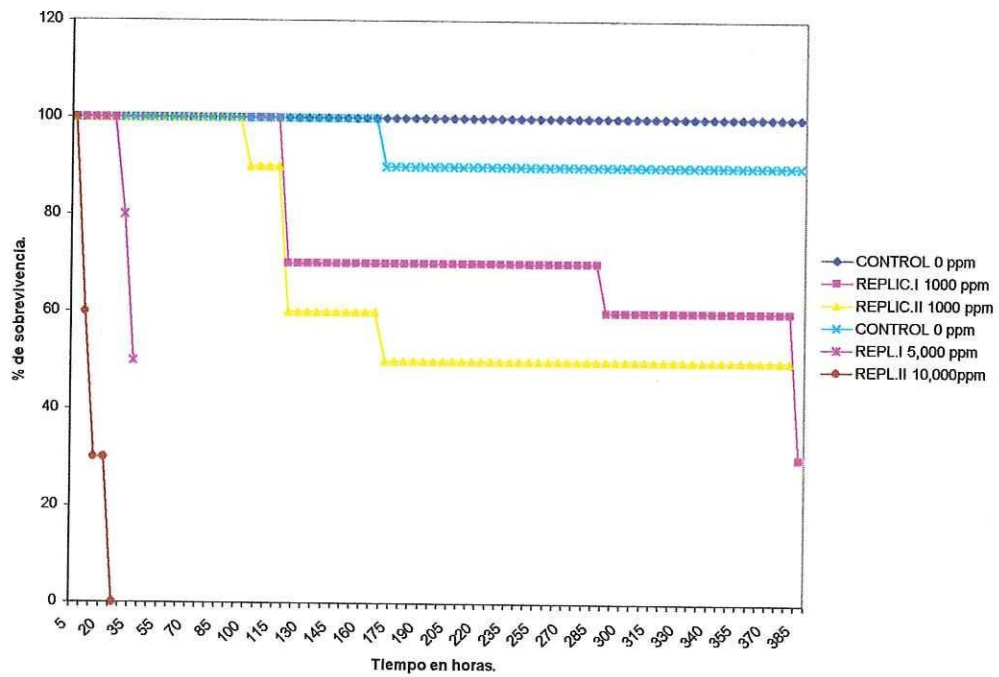


Figura 4. Concentración letal 50 (LC_{50}) en la tilapia *Oreochromis aureus* para las concentraciones probadas de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* a 1000, 5000 y 10000 ppm.

B) CALIFICACIÓN DE BRANQUIAS DURANTE LA EXPOSICIÓN

1) CALIFICACIÓN DE LAS BRANQUIAS EN EXPERIMENTO I

Los resultados obtenidos para tal experimento se observan en la figura 5. Antes de la exposición, se observó que tanto los lotes experimentales como el control presentaron valores de 1 en la mayoría de los organismos y el resto valores de 2 y 3.

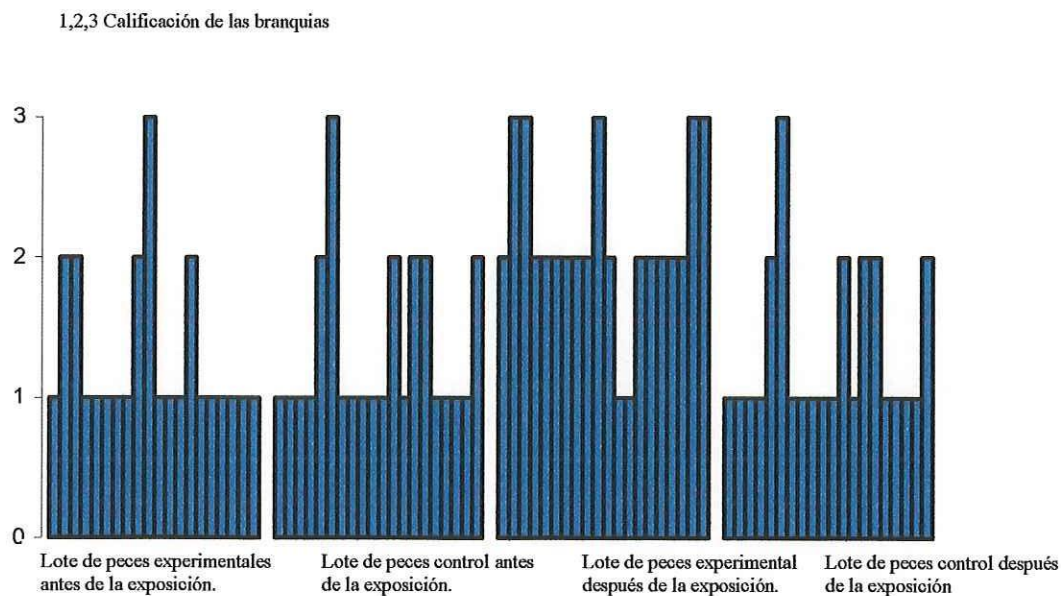


Figura 5. Calificación de las branquias de *Oreochromis aureus* antes y después de la exposición al biopesticida *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* en el experimento I a una concentración de 1,000 ppm.

Después de la exposición, los valores de calificación de la branquias fueron mayores de 1 en el lote experimental, lo que significa que para la mayoría los organismos la concentración de 1,000 ppm tuvo un efecto en los peces del lote experimental, puesto que los valores aumentaron una unidad por la exposición al agente, mientras que el lote control permaneció sin ningún cambio.

2) CALIFICACIÓN DE LAS BRANQUIAS EN EXPERIMENTO II

Los resultados obtenidos para tal experimento se observan en la figura 6. Aquí se observa que antes de la exposición tanto los lotes experimentales como el control presentaron valores de 1 para la mitad de los organismos y el resto presentó valores de 2 y 3.

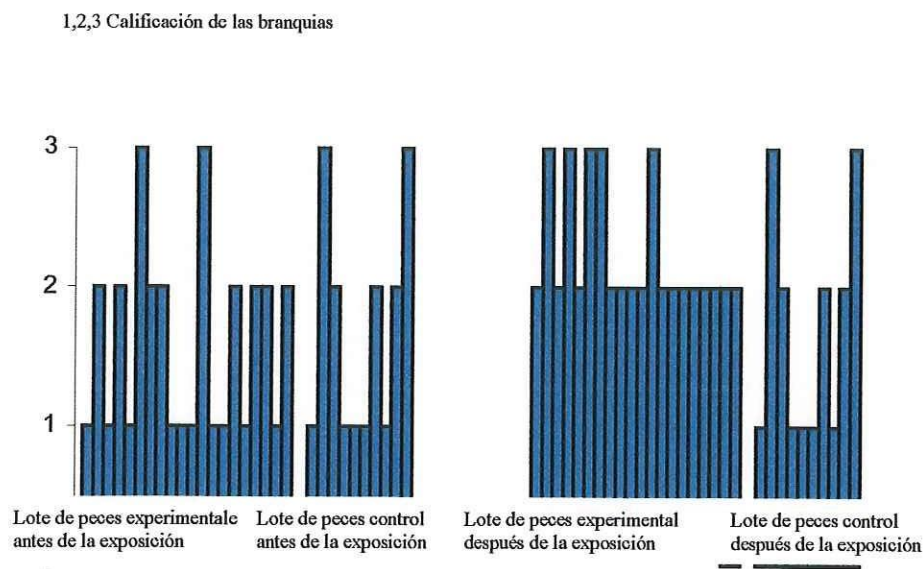


Figura 6. Calificación de las branquias . *O. aureus* antes y después de la exposición al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai* en el experimento II en las concentraciones de 5,000 y 10,000 ppm.

Después de la exposición, los valores de calificación de las branquias fueron mayores de 1 en los lotes experimentales, lo cual indica que para la mayoría los organismos las concentraciones de 5,000 y 10,000 ppm, tuvieron un efecto en los peces de los lotes experimentales, puesto que los valores aumentaron por lo menos una unidad por exposición al agente, mientras que el lote control permaneció sin ningún cambio.

C) DAÑO GENÉTICO

Tabla 1. Comparación de los porcentajes de heteroploidosis obtenidos en lotes controles y experimentales, durante la exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Mn: micronúcleos, tracto dig.: tracto digestivo.

Órgano-parámetro	Controles		Controles Vs Experimentales					
	exp. vs rec		1000 ppm		Exposición		10,000 ppm	
	NDS	P=	NDS	P=	5000 ppm	P=	NDS	P=
Branquia/Mitosis	NDS	P=0.096	NDS	P=0.126	SDS ¹	P=0.029	NDS	P=0.078
Branquia/Mn	NDS	P=0.946	NDS	P=0.911	NDS	P=1.0	NDS	P=0.291
Tracto dig./Mitosis	NDS	P=0.177	NDS	P=0.389	NDS	P=1.0	NDS	P=1.0
Tracto dig./Mn	NDS	P=1.0	NDS	P=0.136	NDS	P=1.0	NDS	P=1.0

Órgano-parámetro	Controles		Controles Vs Experimentales					
	exp. vs rec		1000 ppm		Recuperación		10,000 ppm	
	SDS ²	P=	NDS	P=	5000 ppm	P=	*	*
Branquia/Mitosis	SDS ²	P=0.019	NDS	P=0.317	NDS	P=0.513	*	*
Branquia/Mn	NDS	P=0.142	NDS	P=1.0	SDS ⁵	P=0.050	*	*
Tracto dig./Mitosis	SDS ⁶	P=0.019	NDS	P=1.0	NDS	P=0.127	*	*
Tracto dig./Mn	SDS ⁸	P=0.019	NDS	P=1.0	SDS ⁹	P=0.037	*	*

* No se obtuvieron resultados, ya que todos los peces murieron antes de 48 horas.

NDS: No se obtuvieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL)

SDS: Existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL). Ver anexo para explicación del exponente.

Tabla 2. Comparación de los porcentajes de índice mitótico obtenidos en lotes controles y experimentales, durante la exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Mn: micronúcleos, tracto dig.: tracto digestivo.

Órgano-parámetro	Controles		Controles Vs Experimentales					
	exp. vs rec		1000 ppm		Exposición		10,000 ppm	
					5000 ppm			
Branquia/Mitosis	NDS	P=0.320	NDS	P= 0.916	NDS	P=0.561	NDS	P=0.849
Branquia/Mn	NDS	P=0.676	NDS	P=0.590	NDS	P=0.461	SDS ⁴	P=0.008
Tracto dig./Mitosis	NDS	P=0.211	NDS	P=0.317	NDS	P=0.094	NDS	P=1.0
Tracto dig./Mn	NDS	P=0.200	NDS	P=1.0	NDS	P=0.094	SDS ⁷	P=0.037

Órgano-parámetro	Controles		Controles Vs Experimentales					
	exp. vs rec		1000 ppm		Recuperación		10,000 ppm	
					5000 ppm			
Branquia/Mitosis	NDS	P=0.248	SDS ³	P=0.047	NDS	P=0.487	*	
Branquia/Mn	NDS	P=0.248	NDS	P=0.131	NDS	P=0.817	*	
Tracto dig./Mitosis	NDS	P=0.078	NDS	P=1.0	NDS	P=0.487	*	
Tracto dig./Mn	NDS	P=0.386	NDS	P=0.317	NDS	P=0.317	*	

* No se obtuvieron resultados, ya que todos los peces murieron antes de 48 horas.

NDS: No se obtuvieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL)

SDS: Existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL). Ver anexo para explicación del exponente.

Tabla 3. Comparación de los porcentajes de micronúcleos obtenidos en lotes controles y experimentales, durante la exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Mn: micronúcleos, tracto dig.: tracto digestivo.

Órgano-parámetro	Controles		Controles Vs Experimentales					
			Exposición					
	exp. vs rec		1000 ppm		5000 ppm		10,000 ppm	
Branquia/Mitosis	NDS	P=0.906	NDS	P=0.347	NDS	P=0.180	NDS	P=0.247
Branquia/Mn	NDS	P=0.957	NDS	P=0.590	NDS	P=0.539	NDS	P=0.539
Tracto dig./Mitosis	NDS	P=0.247	NDS	P=0.751	NDS	P=0.264	NDS	P=0.159
Tracto dig./Mn	NDS	P=0.496	NDS	P=0.126	NDS	P=0.107	NDS	P=0.187

Órgano-parámetro	Controles		Controles Vs Experimentales					
			Recuperación					
	exp. vs rec		1000 ppm		5000 ppm		10,000 ppm	
Branquia/Mitosis	NDS	P=0.480	NDS	P=0.282	NDS	P=0.441	*	
Branquia/Mn	NDS	P=0.480	NDS	P=0.885	NDS	P=0.513	*	
Tracto dig./Mitosis	NDS	P=0.271	NDS	P=0.131	NDS	P=0.827	*	
Tracto dig./Mn	NDS	P=0.558	NDS	P=0.317	NDS	P=1.0	*	

* No se obtuvieron resultados, ya que todos los peces murieron antes de 48 horas.
 NDS: No se obtuvieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL)

Tabla 4. Comparación de los porcentajes de heteropicnosis registrados en las tres concentraciones probadas durante la exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Mn: micronúcleos, tracto dig.: tracto digestivo.

Órgano-parámetro	Exposición							
	1000vs5000vs10,000		1000 vs 5000		1000 vs 10,000		5,000 vs 10,000	
Branquia/Mitosis	SDS¹⁰	P=0.043	SDS¹¹	P=0.067	NDS	P=.214	SDS¹²	P=0.041
Branquia/Mn	NDS	P=1.0	NDS	P=1.0	NDS	P=0.979	NDS	P=0.717
Tracto dig./Mitosis	SDS¹⁵	P=0.004	SDS¹⁶	P=0.041	SDS¹⁷	P=0.015	NDS	P=1.0
Tracto dig./Mn	NDS	P=0.070	NDS	P=0.183	NDS	P=1.0	NDS	P=1.0

Órgano-parámetro	Recuperación							
	1000vs5000vs10,000		1000 vs 5000		1000 vs 10,000		5,000 vs 10,000	
Branquia/Mitosis	*		NDS	P=0.038	*		*	
Branquia/Mn	*		NDS	P=0.070	*		*	
Tracto dig./Mitosis	*		SDS¹⁴	P=0.018	*		*	
Tracto dig./Mn	*		SDS²⁵	P=0.006	*		*	

* No se obtuvieron resultados, ya que todos los peces murieron antes de 48 horas.

NDS: No se obtuvieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL)

SDS: Existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL). Ver anexo para explicación del exponente.

Tabla 5. Comparación de los porcentajes de índice mitótico registrados en las tres concentraciones probadas durante la exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Mn: micronúcleos, tracto dig.: tracto digestivo.

Órgano-parámetro	Exposición Tratamientos							
	1000vs5000vs10,000		1000 vs 5000		1000 vs 10,000		5,000 vs 10,000	
Branquia/Mitosis	NDS	P=0.192	NDS	P=0.512	NDS	P=0.359	NDS	P=1.0
Branquia/Mn	NDS	P=0.076	NDS	P=0.888	NDS	P=0.057	SDS ¹³	P=0.029
Tracto dig./Mitosis	SDS ¹⁸	P=0.051	NDS	P=0.175	NDS	P=0.451	SDS ¹⁹	P=0.039
Tracto dig./Mn	SDS ²²	P=0.028	SDS ²³	P=0.062	SDS ²⁴	P=0.031	NDS	P=0.073

Órgano-parámetro	Recuperación Tratamientos							
	1000vs5000vs10,000		1000 vs 5000		1000 vs 10,000		5,000 vs 10,000	
Branquia/Mitosis	*		NDS	P=0.292	*		*	
Branquia/Mn	*		NDS	P=0.541	*		*	
Tracto dig./Mitosis	*		NDS	P=0.180	*		*	
Tracto dig./Mn	*		NDS	P=0.685	*		*	

* No se obtuvieron resultados, ya que todos los peces murieron antes de 48 horas.

NDS: No se obtuvieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL)

SDS: Existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL). Ver anexo para explicación del exponente.

Tabla 6. Comparación de los porcentajes de micronúcleos registrados en las tres concentraciones probadas durante la exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Mn: micronúcleos, tracto dig.: tracto digestivo.

Órgano-parámetro	Exposición Tratamientos							
	1000vs5000vs10,000		1000 vs 5000		1000 vs 10,000		5,000 vs 10,000	
Branquia/Mitosis	NDS	P=0.170	NDS	P=0.685	NDS	P=0.315	NDS	P=0.565
Branquia/Mn	NDS	P=1.0	NDS	P=1.0	NDS	P=1.0	NDS	P=0.588
Tracto dig./Mitosis	SDS ²⁰	P=0.011	SDS ²¹	P=0.063	NDS	P=0.448	NDS	P=0.448
Tracto dig./Mn	NDS	P=2.0	NDS	P=0.172	NDS	P=0.284	NDS	P=0.280

Órgano-parámetro	Recuperación Tratamientos							
	1000vs5000vs10,000		1000 vs 5000		1000 vs 10,000		5,000 vs 10,000	
Branquia/Mitosis	*		NDS	P=0.356	*		*	
Branquia/Mn	*		NDS	P=1.0	*		*	
Tracto dig./Mitosis	*		NDS	P=0.168	*		*	
Tracto dig./Mn	*		NDS	P=0.105	*		*	

* No se obtuvieron resultados, ya que todos los peces murieron antes de 48 horas.

NDS: No se obtuvieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL)

SDS: Existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL). Ver anexo para explicación del exponente.

Tabla 7. Comparación de los porcentajes de heteropicnosis de tratamientos de exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Mn: micronúcleos.

Órgano-parámetro	Exposición vs. Recuperación				
	1,000 ppm		5,000 ppm		10,000 ppm
Branquia/Mitosis	NDS	P=0.537	SDS ²⁶	P=0.040	*
Branquia/Mn	NDS	P=1.0	SDS ²⁷	P=0.036	*
Tracto digestivo/Mitosis	SDS ³¹	P=0.058	SDS ³⁰	P=0.012	*
Tracto digestivo/Mn	NDS	P=0.183	SDS ²⁸	P=0.06	*

* No se obtuvieron resultados, ya que todos los peces murieron antes de 48 horas.

NDS: No se obtuvieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL)

SDS: Existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL). Ver anexo para explicación del exponente.

Tabla 8. Comparación de los porcentajes de índice mitótico en tratamientos de exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Mn: micronúcleos.

Órgano-parámetro	Exposición vs. Recuperación				
	1,000 ppm		5,000 ppm		10,000 ppm
Branquia/Mitosis	NDS	P=0.186	NDS	P=1.0	*
Branquia/Mn	NDS	P=0.164	NDS	P=0.684	*
Tracto digestivo/Mitosis	NDS	P=0.623	NDS	P=0.322	*
Tracto digestivo/Mn	NDS	P=0.453	NDS	P=0.280	*

* No se obtuvieron resultados, ya que todos los peces murieron antes de 48 horas.

NDS: No se obtuvieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL)

Tabla 9. Comparación de los porcentajes de micronúcleos en tratamientos de exposición y recuperación, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Mn: micronúcleos, tracto dig.: tracto digestivo.

Órgano-parámetro	Exposición vs. Recuperación					
	1,000 ppm		5,000 ppm		10,000 ppm	
Branquia/Mitosis	NDS	P=0.348	NDS	P=0.190	*	
Branquia/Mn	NDS	P=1.0	NDS	P=0.617	*	
Tracto dig./Mitosis	NDS	P=0.892	SDS ²⁹	P=0.050	*	
Tracto dig./Mn	NDS	P=0.291	NDS	P=0.272	*	

* No se obtuvieron resultados, ya que todos los peces murieron antes de 48 horas.

NDS: No se obtuvieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL)

SDS: Existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL). Ver anexo para explicación del exponente.

Tabla 10. Comparación de los porcentajes de heteropicnosis, de tratamientos de exposición, recuperación, exposición versus recuperación y órgano-parámetro, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Mn: micronúcleos, tracto dig.: tracto digestivo.

Tratamiento	Órgano- parámetro	1,000 ppm		5,000 ppm		10,000 ppm	
Exposición	Branquias/Mitosis vs Tracto dig./Mitosis	NDS	P=0.427	SDS ³²	P=0.024	SDS ³³	P=0.012
Exposición	Branquias/Mn vs Tracto dig./Mn	NDS	P=0.483	NDS	P=0.238	SDS ³⁹	P=0.025
Recuperación	Branquias/Mitosis Vs Tracto dig./Mitosis	NDS	P=0.531	NDS	P=0.108	*	
Recuperación	Branquias/Mn vs Tracto dig./Mn	NDS	P=0.741	SDS ⁴¹	P=0.040	*	
Exposición Vs recuperación	Branquias/Mitosis Vs Tracto dig./Mitosis	NDS	P=0.375	SDS ³⁸	P=0.049	*	
Exposición Vs recuperación	Branquias/Mn vs Tracto dig./Mn	NDS	P=0.218	NDS	P=0.157	*	

* No se obtuvieron resultados, ya que todos los peces murieron antes de 48 horas.

NDS: No se obtuvieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL)

SDS: Existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL). Ver anexo para explicación del exponente.

Tabla 11. Comparación de los porcentajes de índice mitótico de tratamientos de exposición, recuperación, exposición versus recuperación y órgano-parámetro, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Mn: micronúcleos, tracto dig.: tracto digestivo.

Tratamiento	Organo- parámetro	1,000 ppm		5,000 ppm		10,000 ppm	
Exposición	Branquia/Mitosis Vs Tracto dig./Mitosis	SDS ³⁴	P=0.060	NDS	P=0.419	NDS	P=0.141
Exposición	Branquia/Mn Vs Tracto dig./Mn	NDS	P=0.118	NDS	P=0.086	SDS ⁴⁰	P=0.004
Recuperación	Branquia/Mitosis Vs Tracto dig./Mitosis	SDS ³⁶	P=0.021	NDS	P=0.748		*
Recuperación	Branquia/Mn Vs Tracto dig./Mn	NDS	P=0.375	NDS	P=0.698		*
Exposición vs recuperación	Branquia/Mitosis vs Tracto dig./Mitosis	SDS ³⁷	P=0.056	NDS	P=1.0		*
Exposición vs recuperación	Branquia/Mn Vs Tracto dig./Mn	NDS	P=0.234	NDS	P=0.114		*

* No se obtuvieron resultados, ya que todos los peces murieron antes de 48 horas.

NDS: No se obtuvieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL)

SDS: Existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL). Ver anexo para explicación del exponente.

Tabla 12. Comparación de los porcentajes de micronúcleos en tratamientos de exposición, recuperación, exposición versus recuperación y órgano-parámetro, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Mn: micronúcleos, tracto dig.: tracto digestivo.

Tratamiento	Órgano-parámetro	1,000 ppm		5,000 ppm		10,000 ppm	
Exposición	Branquia/Mitosis Vs Tracto dig./Mitosis	NDS	P=0.914	NDS	P=0.117	SDS ³⁵	P=0.051
Exposición	Branquia/Mn Vs Tracto dig./Mn	NDS	P=0.430	NDS	P=0.345	NDS	P=0.232
Recuperación	Branquia/Mitosis Vs Tracto dig./Mitosis	NDS	P=0.281	NDS	P=1.0	*	*
Recuperación	Branquia/Mn Vs Tracto dig./Mn	NDS	P=0.160	NDS	P=0.800	*	*
Exposición vs recuperación	Branquia/Mitosis Vs Tracto dig./Mitosis	NDS	P=0.085	NDS	P=0.204	*	*
Exposición vs recuperación	Branquia/Mn Vs Tracto dig./Mn	NDS	P=0.308	NDS	P=0.494		

* No se obtuvieron resultados, ya que todos los peces murieron antes de 48 horas.

NDS: No se obtuvieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL)

SDS: Existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$ y 1GL). Ver anexo para explicación del exponente.

D) PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DEL AGUA

TEMPERATURA

Durante el experimento I, la temperatura promedio fue de 17° C (Fig. 7), mientras que en el experimento II fue de 24 °C (Fig. 8). Estas diferencias se debieron a las fechas en que se realizaron los experimentos, el primero durante el invierno y el segundo durante el otoño. El agua utilizada en los experimentos fue abastecida por la red de agua pública, por lo tanto presenta variaciones estacionales, lo que no afecta directamente a los peces puesto que pueden soportar un amplio rango de temperatura.

pH

La figura 9 muestra los valores de pH registrados durante el experimento I, se observa una variación desde las 7 a 9 unidades de pH, mientras que en el experimento II, pH promedio fue de 9. Estas diferencias se debieron a las variaciones estacionales en la calidad del agua abastecida por la red de agua pública. Esta variación no afecta notablemente a los peces puesto que pueden soportar un amplio rango de parámetros fisicoquímicos tales como el pH.

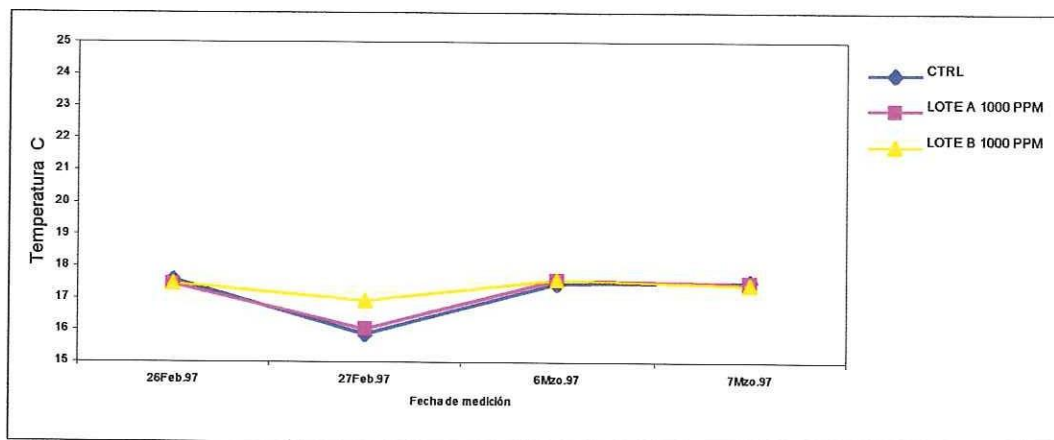


Figura 7. Valores de temperatura registrados en el experimento I durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai* a una concentración de 1,000 ppm.

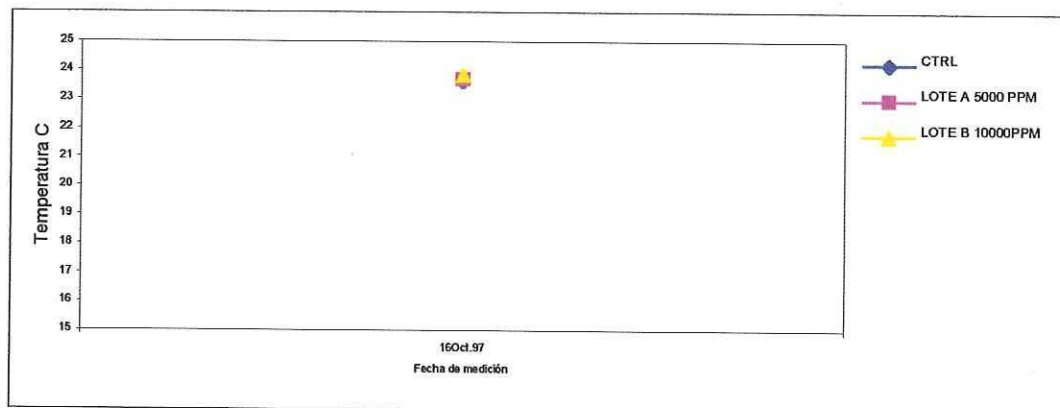


Figura 8. Valores de temperatura registrados en el experimento II, durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai* en las concentraciones de 5,000 y 10,000 ppm.

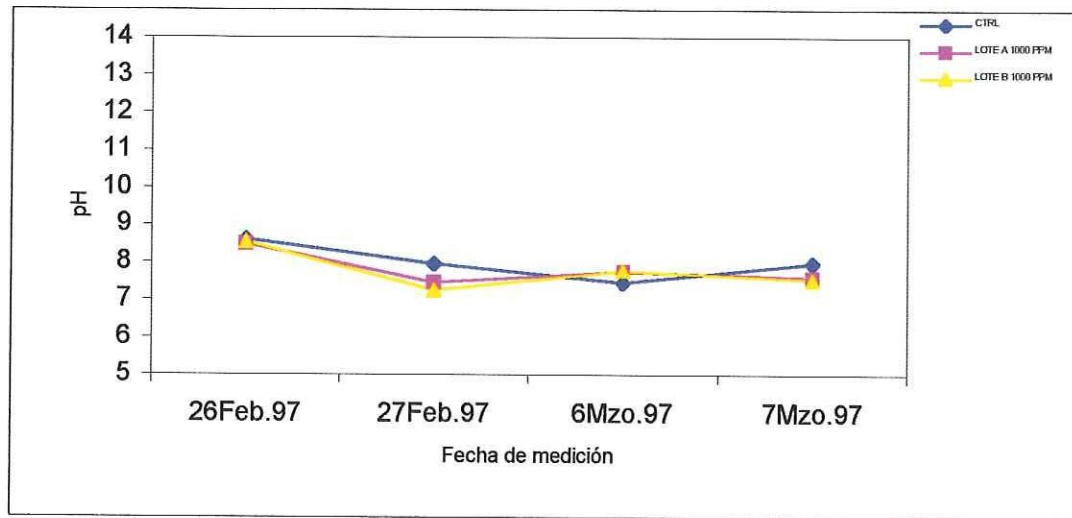


Figura 9. Valores de pH registrados durante el experimento I durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai* a una concentración de 1,000 ppm.



Figura 10. Valores de pH registrados durante el experimento II durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai*, a una concentración de 5,000 y 10,000 ppm.

OXIGENO DISUELTO

Las concentraciones de oxígeno disuelto registradas en el experimento I fueron muy diferentes (Fig. 11). La segunda y cuarta medición coinciden con los días que se realizó un recambio de agua del agente de prueba y el agua de los acuarios. La baja concentración de oxígeno en tales mediciones puede ser ocasionada por el elevado consumo de oxígeno de los peces expuestos al agente experimental.

La concentración promedio de oxígeno disuelto fue de 10 mg/l durante el experimento II (Fig. 12). Tal concentración fue alta posiblemente debido a que este experimento se realizó en la estación de otoño, cuando el agua de la red pública tiene una mayor cantidad de oxígeno disuelto. Las variaciones en la concentración de oxígeno no representan un factor que afecte notablemente la fisiología de estos peces, puesto que resisten bajas concentraciones de oxígeno disuelto en el agua.

SALINIDAD

En la primera medición todos los acuarios presentaron un mismo valor de salinidad, aunque después de hacer los recambios del agente y agua de los acuarios, estos valores variaron notablemente tanto en los acuarios testigos como en los experimentales (Fig. 13 y 14). Esto quizá se debió a la misma variación interindividual de los organismos dentro de cada pecera, además también puede ser que las variaciones estacionales en la calidad del agua fueran las causantes de tales variaciones en las mediciones. Las variaciones en la concentración de salinidad no representan un factor

que afecte notablemente la fisiología de estos peces, puesto que resisten condiciones salobres (rango tolerable para la especie).

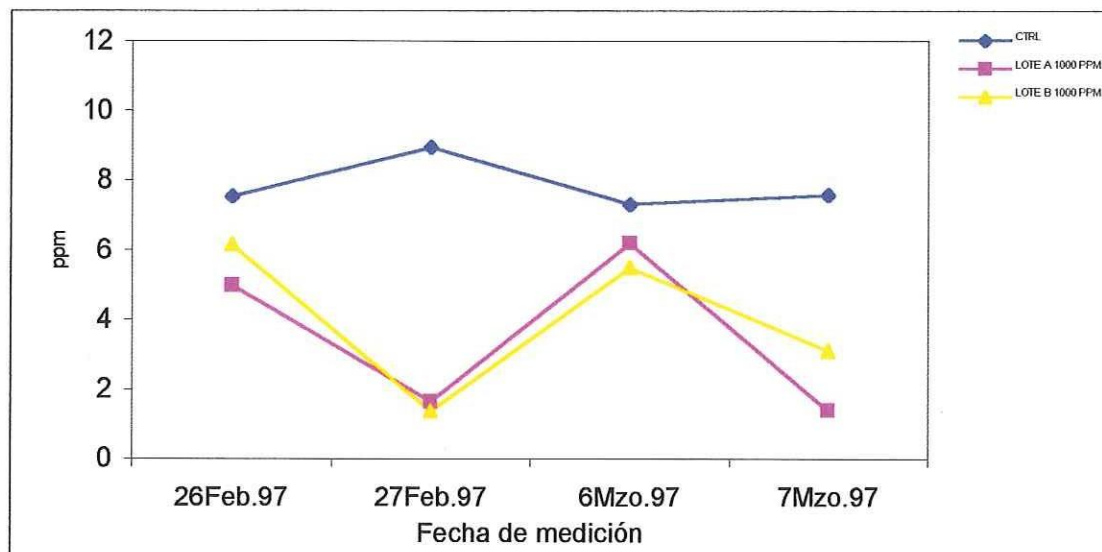


Figura 11. Valores de Oxígeno disuelto registrados durante el experimento I durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai*, a una concentración de 1,000 ppm.



Figura 12. Valores de Oxígeno disuelto registrados durante el experimento II durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai*, a una concentración de 5,000 y 10,000 ppm.

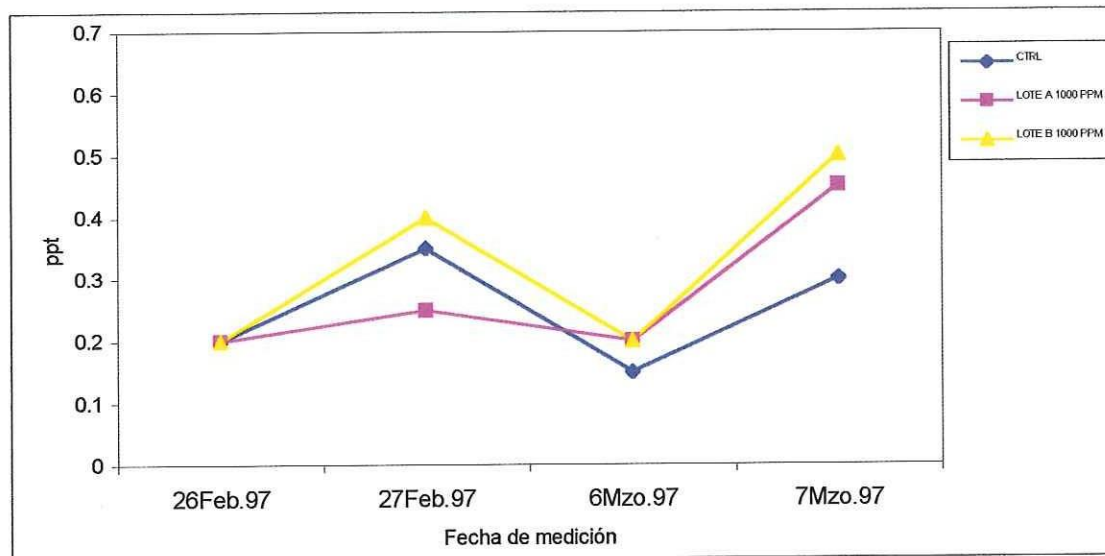


Figura 13. Valores de salinidad durante el experimento I durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai*, a una concentración de 1,000 ppm.

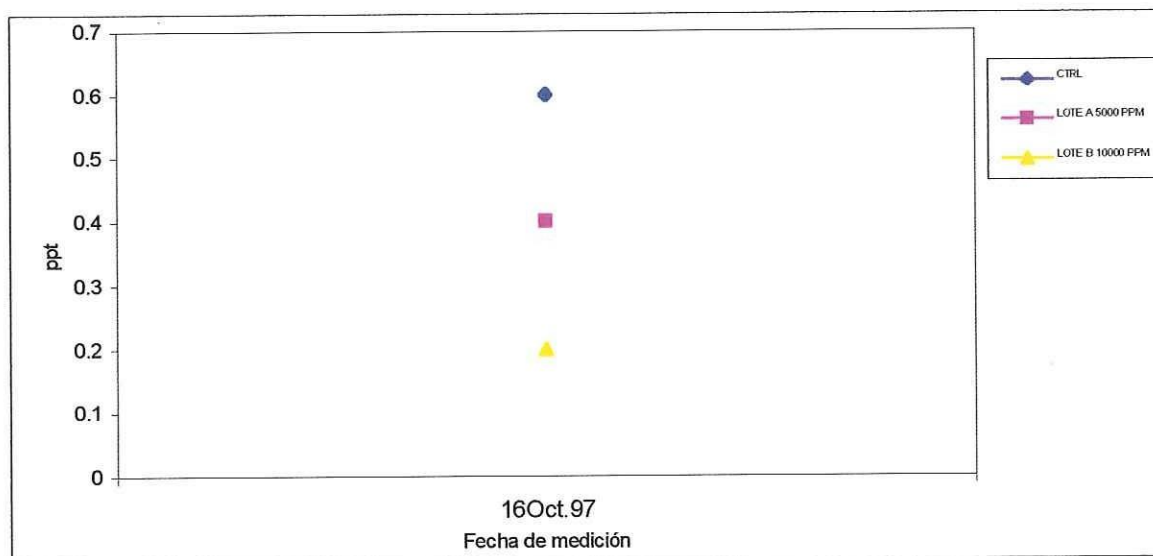


Figura 14. Valores de salinidad durante el experimento II durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai*, a una concentración de 5,000 y 10,000 ppm.

TOTAL DE SÓLIDOS DISUELTOS

Ocurre un efecto semejante a lo que se observó en salinidad. En la primera y tercera medición, los valores del total de sólidos disueltos son muy semejantes, mientras que en la segunda y cuarta medición todos los valores fueron radicalmente diferentes (Fig. 15 y 16). Las variaciones en la concentración del total de sólidos disueltos no representan un factor que afecte notablemente la fisiología de estos peces, puesto que resisten condiciones adversas como estas.

CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

Las primeras tres mediciones de conductividad eléctrica en el experimento I fueron similares, a excepción de un valor en la segunda medición en un acuario control (Fig. 17). En la última medición, la mayoría de los acuarios presentaron valores cercanos a la unidad, lo que significa que el agua contiene gran cantidad de iones lo que la hace una buena conductora de electricidad. Las variaciones en los valores pueden deberse a las variaciones estacionales en la calidad del agua abastecida por la red de agua pública.

Los valores de conductividad eléctrica en el experimento II fueron semejantes a los del experimento I y oscilaron en un rango de 0.4 a 1.1 (Fig. 18). Tal variación pudo deberse a las variaciones estacionales en la calidad del agua abastecida por la red de agua pública, o bien a la liberación de sustancias de desecho por los peces.

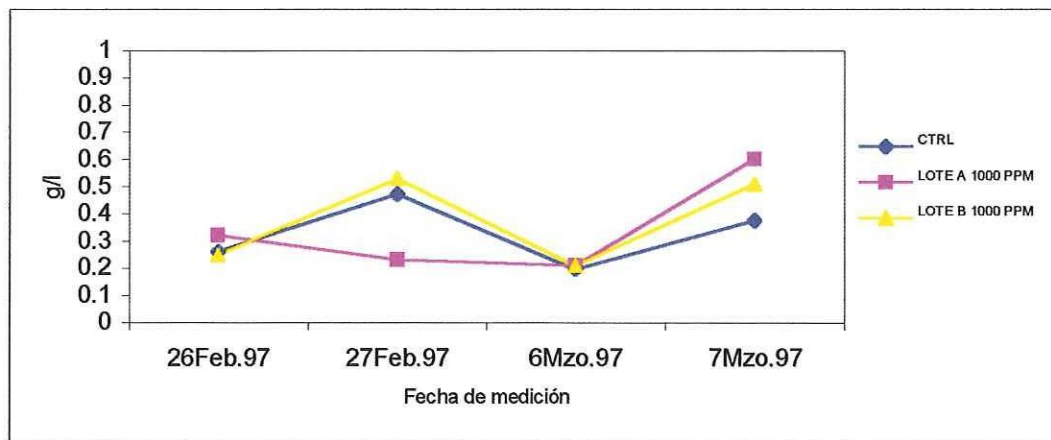


Figura 15. Valores del total de sólidos disueltos registrados en el experimento I durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai*, a una concentración de 1,000 ppm.

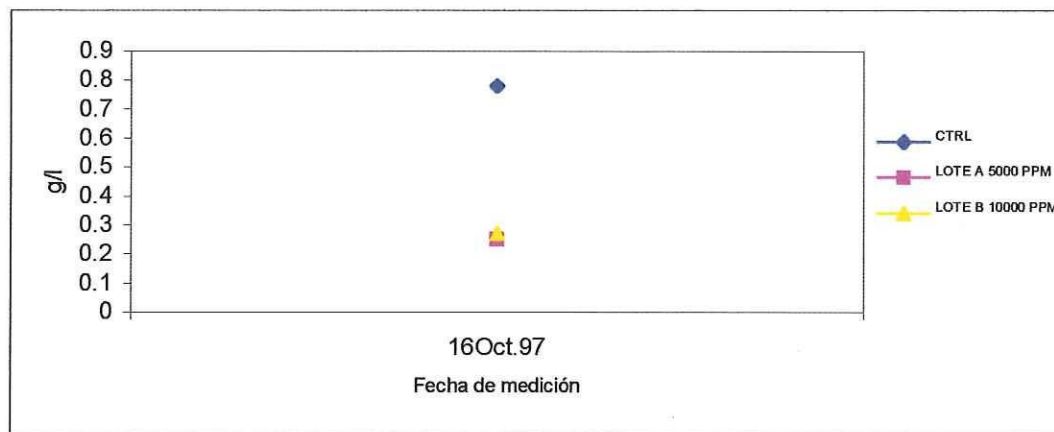


Figura 16. Valores del total de sólidos disueltos registrados en el experimento II durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai*, a una concentración de 5,000 y 10,000 ppm.

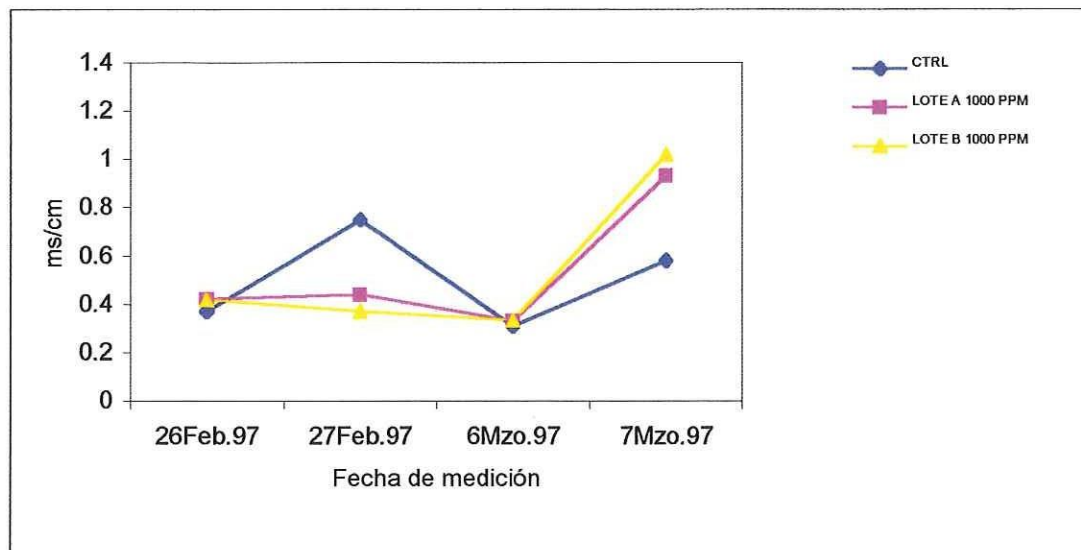


Figura 17. Valores de conductividad eléctrica registrado en el experimento I durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai*. a una concentración de 1,000 ppm.

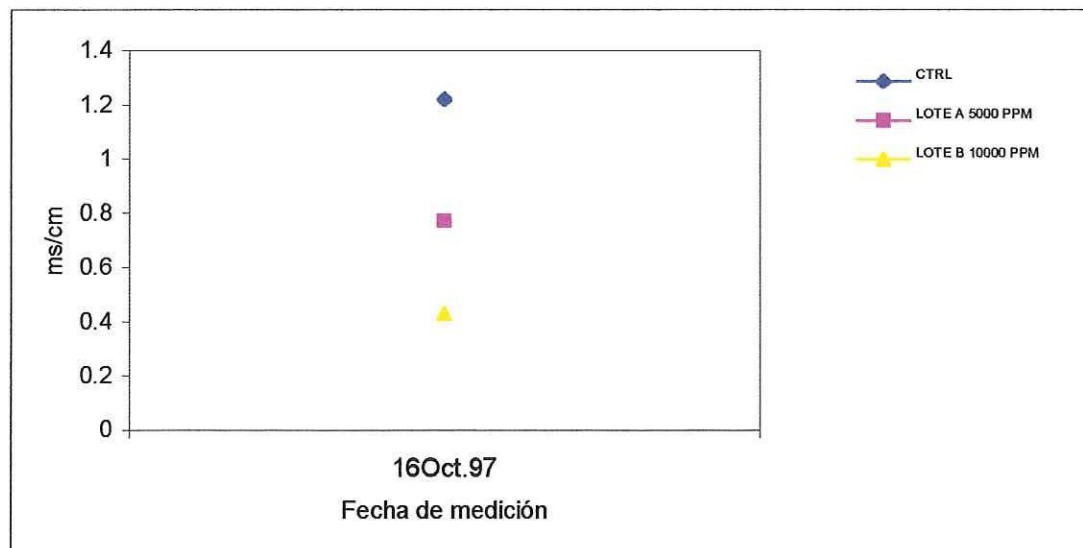


Figura 18. Valores de conductividad eléctrica registrado en el experimento II. durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai*. a una concentración de 5,000 y 10,000 ppm.

CLORUROS

Los valores de cloruros registrados durante el experimento I y II fueron muy semejantes y se mantuvieron dentro de un rango de 0.005–0.02 ppm, a excepción de la tercera medición en el experimento I con valores desde 0.005 y cercanos a 0.025 ppm (Fig. 19 y 20). Las variaciones en los valores de cloruros pudieron deberse a los cambios estacionales en la calidad del agua abastecida por la red de agua pública. Tales valores se encuentran dentro del rango tolerable para la tilapia.

CARBONATOS

Los valores de carbonatos registrados durante el experimento I y II fueron muy semejantes y estuvieron en un rango de 60-100 ppm (Fig. 21 y 22). Las variaciones en los valores de carbonatos pudieron deberse a los cambios estacionales en la calidad del agua abastecida por la red de agua pública. Tales valores se encuentran dentro del rango tolerable para la tilapia.

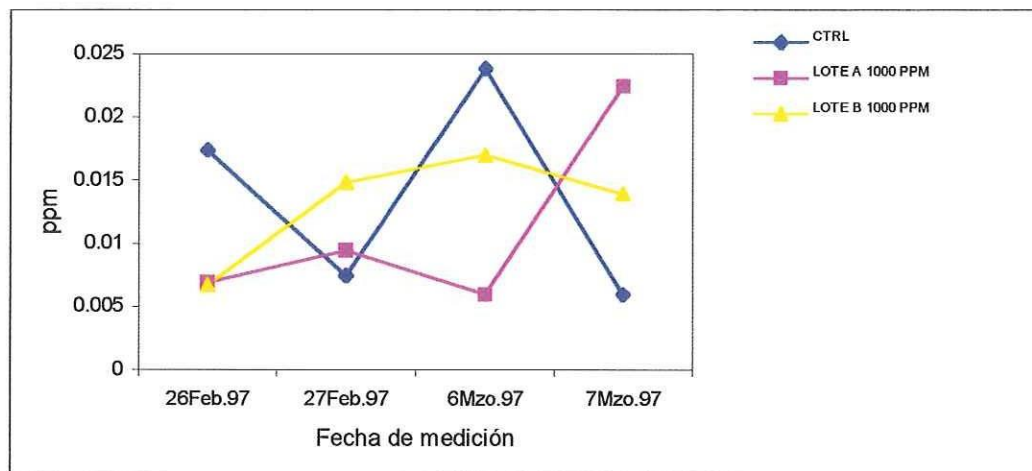


Figura 19. Valores registrados para cloruros en el experimento I. durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai*, a una concentración de 1,000 ppm.

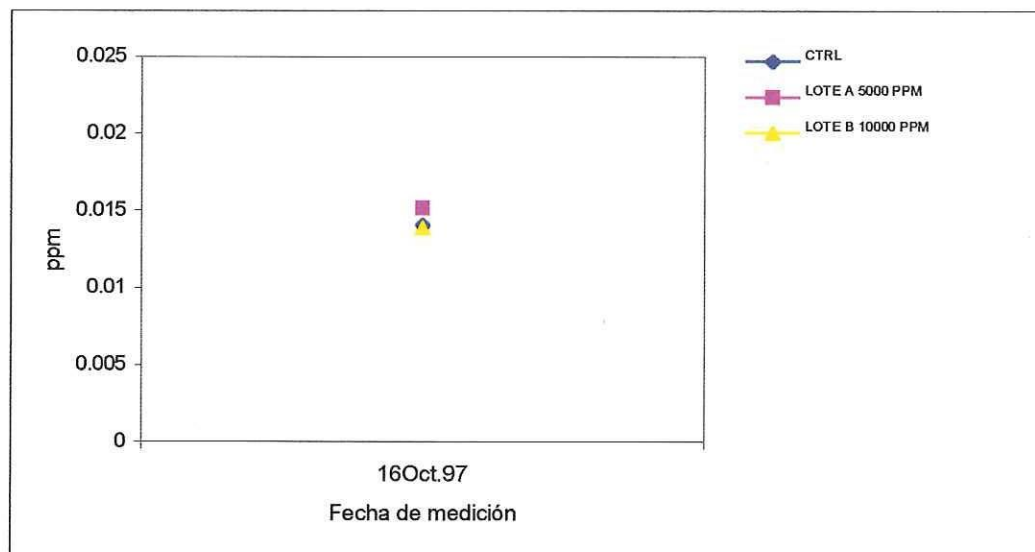


Figura 20. Valores registrados para cloruros en el experimento I durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai*, a una concentración de 1,000 ppm.

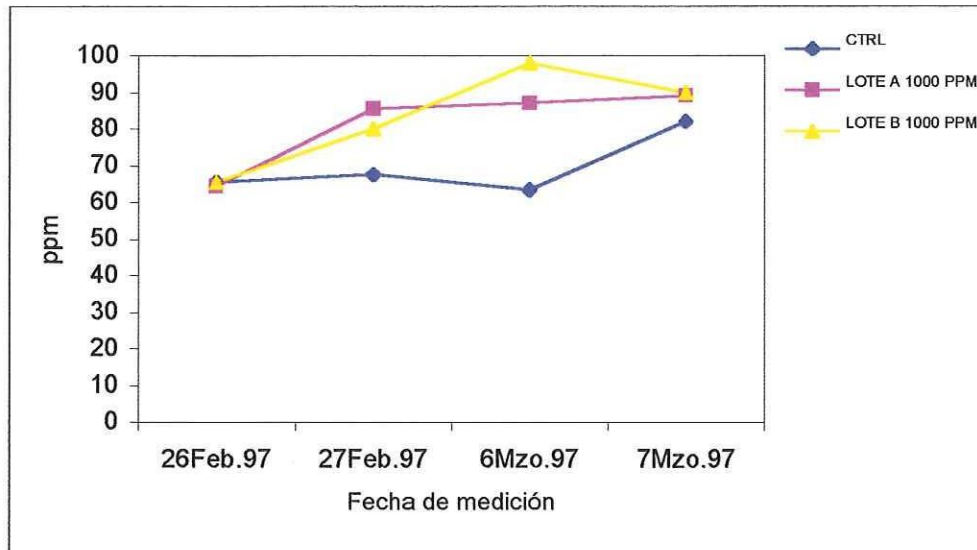


Figura 21. Valores registrados de carbonatos el experimento I durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai*, a una concentración de 1,000 ppm.

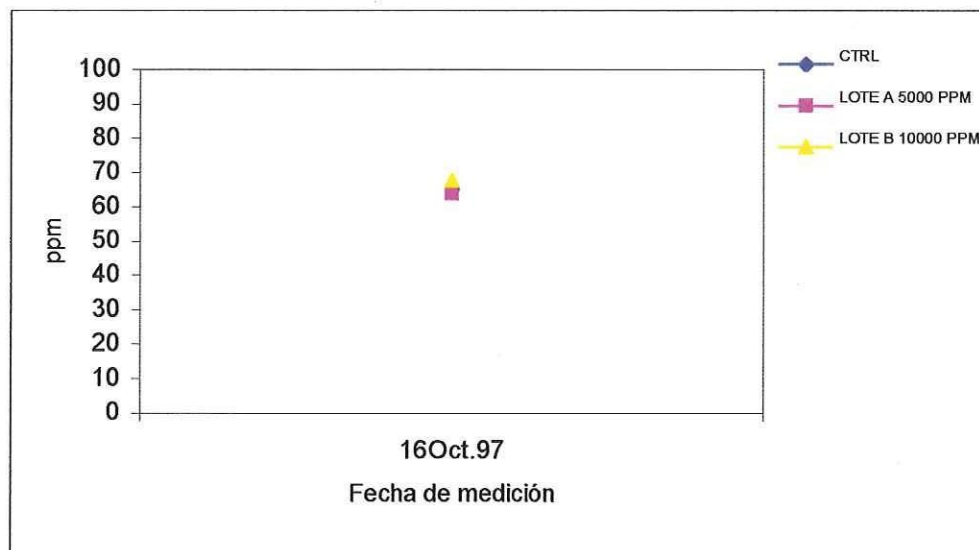


Figura 22. Valores registrados de carbonatos el experimento II durante la exposición de la tilapia *O. aureus* al biopesticida *B. thuringiensis* var. *aizawai*, a una concentración de 5,000 y 10,000 ppm.

VIII. DISCUSIÓN

El insecticida bacterial *Bacillus thuringiensis* es ampliamente aceptado por su gran compatibilidad ambiental, mucho más que otros insecticidas químicos. El serotipo *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* es ampliamente usado en el control de insectos y plagas desfoliadores (lepidópteros) de los bosques. Regularmente es aplicado en grandes extensiones forestales, pudiendo contaminar el cauce de los ríos y zonas riparias y representar un riesgo directo para los organismos acuáticos. Se ha estudiado ampliamente el impacto que representa la aplicación de otro serotipo del biopesticida *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, específico para control de plagas como la mosca negra y mosquitos (dípteros), en ambientes acuáticos donde los organismo no son blanco de acción del plaguicida. En contraste, son pocos los reportes de los efectos en invertebrados acuáticos de la utilización de *B.t.* var. *Kurstaki*, utilizado para el control de plagas en bosques. La mayoría de tales estudios son bioensayos estáticos (Kreutzweiser *et al.*, 1992).

Otro serotipo ampliamente aceptado para el control biológico de plagas en cultivos agrícolas es el *Bacillus thuringiensis* var. *Aizawai*. Este serotipo también es aplicado en grandes extensiones de zonas agrícolas, con las mismas posibles implicaciones de riesgo para la vida de los organismos que no son el blanco de acción al momento de aplicar tratamientos para el control biológico de plagas agrícolas (comunicación personal, Epigmenio Romero, 1996).

Gaygler y Finney (1982) mencionan una alta especificidad tóxica para el control de dípteros como la mosca negra utilizando *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotipo 14), ya que resulta inofensivo para otros insectos (lepidópteros). En

experimentos de campo se ha demostrado la alta eficacia del biopesticida para etapas larvales de dípteros, en ríos con aguas de temperatura cálida y con descarga lenta preferentemente, sin embargo también en efluentes con descarga rápida se han obtenido buenos resultados. Si bien algunos estudios de campo indican que la bacteria puede ser inocua para los organismos no blanco del ambiente acuático, se debe realizar más estudios que permitan evaluar los efectos directos e indirectos de los tratamientos en el ambiente acuático y ripario, así como también los relacionados con la toxicidad de la formulación, concentración, tiempo de exposición, persistencia residual, sustancias inertes de la formulación como el xileno, el cual es indeseable en los ambientes acuáticos. La información generada apoyará el uso de *Bacillus thuringiensis* y la consideración de catalogarlo como el mejor biopesticida para el control biológico de plagas.

Un punto importante a considerar relativo a la toxicidad de *B.t.* es la estrecha relación taxonómica con *B. cereus*, pues éste se ha reportado recientemente como agente causal de enfermedades gastrointestinales. Mediante técnicas moleculares se ha demostrado que algunas variedades de *B.t.* producen enterotoxinas y que comparten el mismo tipo de genes responsables de la toxicidad de *B. cereus* (Bjarne *et al.*, 2001).

Siegel (2001), publica una revisión histórica de la seguridad de insecticidas a base de *B.t.* para mamíferos, en base resultados obtenidos en numerosos estudios de campo y laboratorio, concluye que tales productos no son infecciosos y solamente son tóxicos para mamíferos a dosis de 10⁸ unidades formadoras de colonias (cfu) en ratones (para humanos en base a peso se requieren >10¹¹ cfu). No existe ningún caso de infección en humanos desde 1997, en ese año una persona que presentaba quemaduras y

ámpulas lo predispusieron a una infección, por lo que fue considerado un caso solamente de contaminación. Por lo tanto los productos de *B.t.* son considerados como no nocivos para la salud y además como un excelente pesticida. No obstante, la gran cantidad de recientes investigaciones están ampliando el rango de acción en el que *B.t.* puede ser usado, ya que está comprobado que existen variedades con actividad probada contra moscas, lepidópteros, coleópteros, himenópteros, ácaros y nemátodos, entre otros. Por su alta especificidad, compatibilidad ambiental y fácil producción, los bioinsectidas a base de *B.t.* han tenido una amplia comercialización y aceptación mundial. No obstante, debido a la gran cantidad de productos existentes de *B.t.*, utilizados para control biológico de plagas, deben considerarse los riesgos del surgimiento de plagas resistentes (Feiltson *et al.*, 1992). Además, se deben realizar más estudios de la actividad de *B.t.* y sus interacciones con otros organismos al aplicarse en tratamientos para el control biológico de plagas, puesto que la actividad específica de las diferentes variedades de *B.t.* con las plagas blanco son bien conocidas, así como su potencial para aplicaciones en la generación de productos transgénicos, en cambio, lo que se conoce de su ecología es mínimo (Lambert y Peferoen, 1992).

Se han realizado bioensayos estáticos y de campo relativos a la efectividad y toxicidad de *B.t.* en plagas específicas y organismos no blanco, de bosques, ríos y cultivos agrícolas, (Kreutzweiser *et al.*, 1992; Gaugler y Finney, 1992; Richardson *et al.*, 1994; Tousignant *et al.*, 1993). También se ha evaluado la efectividad, transporte, persistencia, cambios en la composición de la biodiversidad de invertebrados en las comunidades acuáticas después de aplicar *B.t.* (Jackson *et al.*, 1994), valoración de nuevos potenciales de uso de *B.t.* como acaricida, nematocida, etc, (Meadows, *et al.*,

1990; Hoy y Ouyang, 1987). Además, se publican constantemente resultados de investigaciones relativos a la composición y caracterización molecular de las toxinas producidas por *B.t.* y sobre las implicaciones de manejo para la producción de productos transgénicos. En cambio, los estudios de toxicidad relacionados con los efectos letales, subletales, crónicos y daño genético por exposición a *B.t.* en macroinvertebrados de ambientes acuáticos (Fortin *et al.*, 1986, Wipfli *et al.*, 1994; Undeem *et al.*, 1987; Brown, 1998) así como lo reportado en mamíferos (Siegel *et al.*, 1987; Siegel, 2001), son mínimos.

Si bien el uso de *B.t.* en el control biológico de plagas es ampliamente aceptado, se considera que su uso ha sido lento, por los posibles efectos deletereos en especies no blanco de las estructuras de las cadenas tróficas y pesquerías en los ambientes acuáticos en donde se ha aplicado (Lacey y Mulla 1990 en Wipfli *et al.*, 1994). Pocos estudios han investigado la toxicidad de *B.t.* var. *israelensis* en peces. Lo mismo ocurre para estudios indirectos (efectos en cadenas tróficas) de la interacción de insectos como la mosca negra que es un componente alimenticio de y otros organismos acuáticos (Davies 1981,1991; Crosskey, 1991).

Fortin *et al.* (1986) mencionan que la exposición de una formulación líquida de *B. thuringiensis* var. *israelensis* utilizado como control biológico para la mosca negra, en concentraciones de 4,500 y 6,000 ppm aplicado en juveniles de trucha *Salvelinus fontinalis* causó una mortalidad de 20 y 86.4% respectivamente en 45 minutos. A concentraciones mayores de 3,000 ppm se aprecia un decremento en la movilidad, seguida de periodos de recuperación, dependiendo de la concentración, por lo que clasificaron tal efecto como subletal. Al parecer los juveniles de trucha *Salvelinus*

fontinalis son muy susceptibles a altas dosis de *B.t.* var. *israelensis*. Por análisis complementarios de cromatografía de gases encontraron un 2% de xileno en la formulación. También probaron *B.t.* var. *israelensis* liofilizado por 48 horas, a concentraciones de 60 ppm y a 300 ppm, sin encontrar mortalidad, por lo que sospechan y atribuyen la mortalidad a componentes inertes como el xileno e hidrocarburos aromáticos monocíclicos de la formulación, más que a las esporas del *B.t.*

Wipfli *et al.* (1994) publica un estudio de toxicidad en mosca negra (*Cnephias dacotensis*) alimentadas con *B.t.* var. *Israelensis*, y larvas (82 mm de largo) de la trucha de arroyo (*S. fontanelis*), trucha café (*Salmo trutta*) y trucha plateada (*Oncorhynchus mykiss*) expuestas de forma directa e indirecta al biopesticida. La mortalidad de las tres truchas estudiadas en condiciones de laboratorio y expuestas a *B.t.* var. *israelensis*, aumento solo ante dosis iguales o mayores a 12,000 veces la dosis recomendada para usarse en el campo. No existen diferencias en mortalidad al alimentar alevines de los tres tipos de truchas con el agente desnaturalizado en autoclave y aplicado sin desnaturalizar, lo que indica que la muerte puede ser producida por los componentes inertes y no por la patogenicidad de las toxinas del *B.t.* var. *israelensis*. En 48 horas se obtiene la curva de concentración letal 50 (LC_{50}) para los alevines de trucha de arroyo y de trucha café en un rango de concentración de 1561–2321 ppm utilizando el agente desnaturalizado en autoclave y sin desnaturalizar. Microfotografías obtenidas por microscopía electrónica muestran la acumulación de partículas y mucus en la superficies de las branquias expuestas por 4 horas a una concentración de 2,000 ppm. Los niveles de oxígeno y dióxido de carbono en la sangre de los peces que fueron expuestos y no expuestos a *B.t.* var. *Israelensis* (2,000 ppm durante 4 h) fueron similares. Alevines de trucha café (43

mm de largo) alimentados en exceso con larvas vivas y muertas de *Cnephias dacotensis*, las que fueron a su vez alimentadas con *B.t.* var. *israelensis*, presentaron semejante mortalidad y tasa de crecimiento después de 30 días de la exposición al biopesticida.

En este mismo estudio hace referencia a un estudio realizado por Snarki (1990), donde la mortalidad para el pececillo cebo *Pimephales promelas* es atribuida al agotamiento de oxígeno, debido a la formulación de los ingredientes de *B.t.* var. *israelensis* más que por la toxicidad de las esporas.

Merrit *et al.* (1989) describe que no existe un cambio significativo en el número de peces después de la aplicación de *B.t.* var. *israelensis* en el río Michigan, en experimentos a corto plazo. La mayoría de las especies de peces presentaban una pobre abundancia poblacional, por lo que resulta poco factible detectar cambios en las poblaciones. También se estudiaron los hábitos alimenticios de *S. fontanelis* y el esculpínido *Cottus cognatus*, los que no fueron afectados por *B.t.* var. *israelensis* (Gibbs *et al.*, 1986).

De las tres concentraciones probadas en el presente estudio, la de 1,000 ppm no representó una concentración letal pues los organismos experimentales no se murieron después de 48 horas de exposición; sin embargo, tal concentración se pudiera considerar como subletal puesto que se observó mortalidad de los peces conforme transcurrió el tiempo de exposición al insecticida (Fig. 4). Conforme se incrementó la concentración del insecticida (5,000 y 10,000 ppm), se observó que el efecto fue letal, presentándose a las 48 hrs de exposición la muerte de la mitad de la población experimental para la concentración de 5,000 ppm y muerte total e inmediata para la concentración de 10,000 ppm. Los resultados obtenidos coinciden con algunos de las investigaciones antes

mencionadas para toxicidad de *B.t.* en peces (Wipfli *et al.*, 1994 y Fortin *et al.*, 1986). La tilapia *Oreochromis aureus* es susceptible a mortalidad, exponiéndola a concentraciones mayores de 5000 ppm de *B.t.* var. *aizawai*. La toxicidad de los productos a base de *B.t.* quizá debiera reconsiderarse debido a resultados obtenidos en investigaciones de peces expuestos a productos a base de *B.t.*, puesto que en algunas ocasiones su toxicidad puede ser mayor a la reportada para pesticidas sintéticos. Por ejemplo, Brown *et al.* (1998) comparó la toxicidad aguda en el pez ojo azul del pacífico, *Pseudomiugil signifer* con cinco pesticidas, dos organofosforados (Pirimifosmetil y temefos) y tres compuestos alternativos (*B.t.* var. *israelensis*, s-metopreno y piriproxifeno), en proceso de licitación en Australia. Pirimifosmetil resultó ser el compuesto más tóxico, con una concentración letal 50 (LC₅₀) de 0.091 ppm (0.3 veces la concentración efectiva de campo [EFC] a una profundidad de 15 cm). Temefos tuvo una concentración letal 50 (LC₅₀) de 0.594 ppm (9.9 veces la dosis EFC). *B.t.* var. *israelensis* y piriproxifeno tuvieron una concentración letal de 50 (LC₅₀) de 6.1 x 10¹¹ (Unidades Internacionales de Toxicidad [477 veces EFC]) y 0.854 ppm (106 veces EFC), respectivamente. s-Metopreno fue el menos tóxico, ya que no causó mortalidad aún a 500 veces de su EFC.

Las branquias son la primera vía de entrada para los hidrocarburos aromáticos monocíclicos en peces, los cuales son rápidamente depurados por el organismo. Sin embargo, la capacidad de desintoxicación puede ser excedida por la alta concentración del xenobiótico, lo que conlleva a su acumulación en los órganos y la consecuente aparición de síntomas de estrés fisiológico, inmovilización, pérdida de equilibrio,

movimientos operculares acelerados, nado errático y hacia la superficie, etc. (Rudolph *et al.*, 2001).

La tilapia, *Oreochromis aureus*, evaluada en este trabajo después de ser expuesta a tres concentraciones de *B.t.*, mostró diferentes patrones de nado (errático, al fondo del acuario o hacia la superficie) y pérdida del equilibrio, lo que indica un posible efecto en la vejiga natatoria y en otros órganos vitales. Otros síntomas observados fueron: movimientos operculares acelerados, inmovilidad, hacinamiento en el fondo y finalmente la muerte de los organismos. Tales efectos de estrés son similares a los reportados por Wipfli *et al.* (1994) y Fortin *et al.* (1986).

Con el fin de evaluar los posibles efectos por exposición al pesticida, se realizó una calificación arbitraria de las branquias de acuerdo al patrón de coloración de los organismos control. Fue evidente el cambio de la coloración conforme transcurrió el tiempo de exposición. El efecto causado por el insecticida se observó primeramente por la aparición de manchas blancas, lo que indica la presencia de organismos oportunistas por la afectación del sistema inmune. Seguido de esto, se observó un cambio de coloración que fue del rojo intenso a otro de color rojizo pardo hasta café, lo que indica que se estaba produciendo una septicemia y degradación gradual del tejido por exposición al agente tóxico. Finalmente, se presentó la muerte del organismo seguida por la necrosis de las branquias.

Con el propósito de conocer cuál o cuáles fueron los órganos internos lesionados por la exposición al bioinsecticida, se realiza disección de órganos blanco y posterior análisis histológico, así como el cultivo de bacterias recuperadas del inóculo, lo que es utilizado para determinar la virulencia del agente. La muestra puede obtenerse en una

escala de tiempo durante la experimentación lo que permite determinar la ruta de infección de la bacteria por órganos, grado de invasión bacteriano y ubicar los daños existentes a nivel histológico. Siegel *et al.* (1987) probaron la toxicidad e infectividad de *B.t. var. israelensis* en ratas, ratones y conejos. La administración oral y en aerosol no provocó la muerte en ratas. Por inyección intraperitoneal aplicando una preparación en ratones sin timo provocó una muerte substancial (26/42), pero con una preparación diferente (inóculo esterilizado en autoclave) no se presentó mortalidad. El insecticida microbiano puede permanecer hasta 7 semanas en el bazo, pero la multiplicación bacteriana no es evidente al menos en mamíferos. Al parecer las bacterias son reconocidas por el hospedero como partículas extrañas. La aplicación en polvo de *B.t. var. israelensis* provoca mínima irritación ocular en conejos, en cambio aplicado en pasta ocasiona severa conjuntivitis ocular. Dichos autores concluyen que *B.t. var. israelensis* no es virulento y no tiene poder invasivo en mamíferos.

Después de la exposición con *B.t. var. aizawai*, la tilapia, *Oreochromis aureus*, presentó síntomas muy similares en las branquias a lo reportado por Rudolph *et al.* (2001), quienes describieron los efectos a la exposición de una fracción de hidrocarburos en la trucha *Oncorhynchus mykiss*. Ellos probaron una fracción de hidrocarburos considerada como contaminante, generada por la navegación de barcos en un ambiente marino. La composición de la muestra estaba conformada principalmente por compuestos aromáticos; 1,2,4 trimetilbenceno, 1-metil-3-(1-metiletil)benceno, 2-propilbenceno, 2-metilnaftaleno, 2,6-dimetilnaftaleno, 2-3-6-trimetil naftaleno, los que han sido identificados como xenobióticos carcinogénicos, con la capacidad de disolver los componentes de la membrana celular e incrementar la sensibilidad de los organismos

de prueba a los contaminantes estudiados. Las concentraciones probadas para determinar concentración subletal fueron, control (0), 0.043, 0.070, 0.120, 0.230, 0.250, 0.430, 0.870 y 2 mg L⁻¹ en 7, 18 y 30 días de exposición. Las observaciones macroscópicas realizadas, para evaluar el daño por la exposición, se basaron en los criterios propuestos por la Comisión Internacional para la Exploración del mar [ICES] (1986) y análisis histológico de hígado, piel y branquias de todos los organismos expuestos. Uno de los síntomas más obvios fue la decoloración de la branquias, en todos los tiempos probados de exposición, en comparación con los controles, además se apreciaba una desintegración de sus filamentos, separación del epitelio de la base lamelar, daño de los filamentos branquiales, las lamelas secundarias asociadas a hipertofia y telangiectasia laminar. La marcada decoloración de las branquias se acompañó por deformaciones a nivel microscópico. Flores (1992) atribuye tal decoloración en las branquias de *O. mykiss* a una reducción en el consumo de oxígeno. Sin embargo, la deformación antes mencionada es atribuible al agente tóxico ya que el sistema de experimentación fue suficientemente aireado, por lo que el autor descarta tal supuesto. Las observaciones de la deformaciones a nivel microscópico parecen estar acompañadas de interferencia de las funciones fisiológicas de las branquias. A manera de conclusión mencionan que la exposición de *O. mykiss* a largo plazo a concentraciones subletales de hidrocarburos puede ser deletereo para los organismos así como también a períodos de altas concentraciones de contaminantes. Estos reportes son semejantes a lo observado en este trabajo. Tal vez el fenómeno de la decoloración de las branquias es una respuesta fisiológica generalizada en las branquias de peces a la exposición de sustancias xenobióticas.

Los métodos citogenéticos son probablemente los más sensitivos y eficientes para detectar los efectos de los agentes genotóxicos. Los peces son una excelente fuente de material para estudio de mutágenos y/o carcinógenos potenciales disponibles en los cuerpos de agua, puesto que son los organismos vertebrados de los ambientes acuáticos que pueden metabolizar, concentrar y almacenar los contaminantes en suspensión (Al-Sabti, 1991). Algunos efectos de los agentes genotóxicos actúan en células tipo específicas, por lo que se requiere aplicar técnicas específicas que permitan detectar daño en el DNA, características de los cromosomas y fases del ciclo celular (Pandurangi *et al.*, 1995).

Por muchos años los análisis químicos fueron empleados para realizar estudios de contaminantes en los ambientes acuáticos. Estas técnicas actualmente no pueden detectar y cuantificar todos los contaminantes presentes en una muestra de agua. Además los análisis químicos no consideran fenómenos ambientales tales como biodisponibilidad, bioacumulación, sinergismo y antagonismo entre los diferentes tipos de compuestos. Por esta razón muchas investigaciones de efectos de xenobióticos están basadas en bioensayos con organismos ya sea *in vivo* y/o *in vitro*. Se debe considerar que para los estudios *in vitro* se debe hacer un extracto que concentre el agente a probar, por lo cual se pueden modificar las propiedades originales, sin el conocimiento exacto de los efectos de los contaminantes. Por lo cual la mejor forma de evaluar el efecto de los contaminantes ambientales es utilizando bioensayos *in vivo*, los que ofrecen una respuesta global de los efectos de todos los contaminantes en el medio donde se encuentran (Djomo *et al.*, 2000).

Una de las mejores formas de evaluar el riesgo asociado a los contaminantes ambientales es con bioensayos de genotoxicidad a corto plazo; tales como la prueba de Ames, intercambio de cromátidas hermanas, prueba de micronúcleos. Por ejemplo, entre las diferentes metodologías para evaluar genotoxicidad, la prueba de micronúcleos en puntas de raíces de *Vicia faba* es particularmente sensitiva a agentes mitoclásticos y clastogénicos, los resultados son confiables, es relativamente sencilla y se requieren condiciones mínimas de laboratorio (Ohe *et al.*, 1993; Sujburt *et al.*, 1993; Gauthier *et al.*, 1994).

Mediante la comparación de los tratamientos control contra los tratamientos experimentales se observa que en la tilapia, *O. aureus*, el agente puede tener un efecto mitogénico y citotóxico, tanto para núcleos interfásicos de células epiteliales de branquia y tracto digestivo en las tres concentraciones probadas. Tal efecto es producido durante la exposición y puede perdurar después del tiempo de recuperación, además el agente probado puede inducir alteraciones en el material nuclear tal como la heteropicnosis que es también considerada como daño genético, (ver anexos para comparación de tratamientos controles contra experimentales). Cabe aclarar que si bien en la mayoría de los casos en que se registran diferencias estadísticas significativas, no existió correlación entre las variables implicadas en el tratamiento y solo algunas tienen realmente significancia biológica. Sin embargo, los resultados evidencian que el agente probado induce al daño celular en concentraciones superiores a 1,000 ppm.

De la comparación por cada concentración probada como tratamiento, se tiene que a semejanza del análisis anterior no existe una tendencia clara del efecto por concentración probada y parámetro evaluado. Así también el efecto del agente puede ser

mitogénico y citotóxico así como inductor de la heteropicnosis. Además el *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* tiene un bajo efecto como clastógeno pues su efecto es mínimo en la inducción de micronúcleos. Sin embargo, al comparar los tratamientos de exposición contra los tratamientos de recuperación se observa que tal efecto puede ser encubierto y queda de manifiesto en branquias al observar micronúcleos aún después de transcurrido el tiempo de recuperación en agua limpia. Si bien los casos en que se aprecia la inducción para la formación de micronúcleos, son mínimos, es posible considerar que el *B.t.* var. *aizawai* tiene un leve efecto clastogénico.

En cuanto a los tratamientos de exposición contra los de recuperación por órgano, se observa que las células de tracto digestivo son más sensibles al agente probado que las de branquia, puesto que en las células de tracto digestivo no se detectan mitosis en una concentración de 5,000 ppm. También con esta comparación se tiene que el agente puede tener un efecto inductor de la heteropicnosis en branquia más que en tracto digestivo en una concentración de 5,000 ppm.

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos del agua se tiene que no influenciaron la evaluación del daño genético, a pesar de que se observaron variaciones entre las mediciones hechas entre el experimento y en las diferentes fechas experimentales; esto es debido a que la calidad del agua varía según la calidad estacional durante el año o el día en el agua que es abastecida por la red pública de agua potable.

IX. CONCLUSIONES

1. El uso de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* como biopesticida agrícola es ampliamente aceptado a nivel mundial. Sin embargo, existe una estrecha relación entre *Bacillus thuringiensis* con otras especies del género *Bacillus* con alto potencial tóxico, que aún no han sido consideradas en estudios de los efectos provocados al resto de los organismos no blanco que componen las cadenas tróficas en las que es incorporado cuando se aplica como control biológico de plagas.
2. Algunos productos a base de *B.t.*, pueden resultar tóxicos para una amplia variedad de especies de insectos lepidópteros, también pueden resultar tóxicos en mamíferos.
3. Si bien el *B.t.* se considera como no tóxico para la salud de humanos, se deben de realizar mas estudios que sustenten tal supuesto.
4. Los estudios de los efectos tóxicos y mutagénicos provocados por el *B.t.* en ambientes acuáticos, se reducen a unos cuantos. Igualmente los referentes a la interacción ecológica entre el pesticida y el resto de los organismos de las cadenas tróficas que no son el blanco de acción del biopesticida.
5. La concentración probada del agente a 1,000 ppm no es letal, pero si puede resultar subletal conforme transcurre el tiempo de recuperación.

6. La concentración probada del agente a 5,000 ppm es letal a las 48 horas de exposición.
7. La concentración probada del agente a 10,000 ppm es letal. A las 48 horas de exposición resulta letal fulminante.
8. Todas las concentraciones probadas para el agente provocan efectos etiológicos y fisiológicos al parecer en órganos internos, lo que conlleva a un detrimento en el vigor de los peces y consecuentemente los puede conducir a la muerte.
9. Las branquias pueden considerarse como órganos indicadores del efecto fisiológico pernicioso resultante a la exposición al pesticida.
10. Al comparar el daño genético en tratamientos control contra experimentales, y las tres concentraciones probadas, no se observa un patrón o relación por dosis-efecto y parámetro evaluado, ya que el agente puede tener un efecto mitogénico y citotóxico tanto para núcleos interfásicos de células epiteliales en branquia e intestino en las tres concentraciones probadas. Tal efecto es producido durante la exposición y puede perdurar después del tiempo de recuperación, además el agente probado puede inducir alteraciones en el material nuclear tal como la heteropiconosis que es también considerada como daño genético.

11. Al evaluar el daño genético los tratamientos de exposición contra los tratamientos de recuperación, es manifiesto que el agente puede tener un efecto clastogénico que es encubierto después de la exposición, pero la presencia de tal daño puede perdurar aún después del tiempo de recuperación en agua limpia.

12. Las células del tracto digestivo son más sensibles al agente (efecto citotóxico) probado que las de branquia, puesto que en las primeras no se detectan mitosis en una concentración de 5,000 ppm después de la exposición. El agente puede tener un efecto inductor de la heteroplicnosis en branquia más que en las de intestino en una concentración de 5,000 ppm.

13. Los parámetros fisicoquímicos registrados durante la experimentación no interfieren en la evaluación del daño genético, a pesar de que se observaron variaciones entre tales mediciones. Estas variaciones se debieron a los cambios estacionales en el agua abastecida por la red pública de agua potable.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, S.M., Crumby, W.D., Greeley, M.S., Ryon, M.G. and Schilling, E.M. 1992a. Relationships between physiological and fish population responses in contaminated stream. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11:1549-1557.
- Adams, S.M., W.D. Crumby, M.S. Greeley. 1992b. Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. *Ecotoxicol. Environment. Safety*, 24:347-360.
- Albert, A.L. 1988. *Curso Básico de Toxicología*. Editorial Limusa, México. 7-39 pp.
- Alpuche, G.L. 1991. Plaguicidas organoclorados y medio ambiente. *Ciencia y Desarrollo*, 16.
- Al-Sabti, K. 1991. *Handbook of genotoxic effects and fish chromosomes*. Kristoff, Ljubljana, Slovenia.
- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D. 1973. Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70: 2281-2285.
- Barret, D.J. 1983. Systematics of fishes of the genus *Tilapia* (Perciformes: Cichlidae) in the lower Colorado River basin. Master of Science thesis, Arizona State University. 56 p.
- Bevelhimer, S.M. 1995. Recent Advances in Contaminant Assessment Offer Proactive Alternatives for Managing Contaminated Fisheries. *Fisheries*, 20.
- Bjarne, M.H. and Niels B.H. 2001. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Applied and environmental microbiology*, 67: 185-189.
- Bojórquez, R. G. 1994. Efectos genotóxicos de Azinfos metílicos y Oxidemetón: insecticidas de amplio uso en Baja California. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C. México.
- Brown, E.R., Haazdra, J.J., Keith, L., Greenspan, I., Kwapinsky, J.B.G. and Beamer, P. 1973. Frequency of fish tumors found in a polluted watershed as compared to non polluted Canadian Water. *Cancer Res.*, 33:189-198.

- Brown, E.R., Koch, E., Sinclair, T.F., Spitzer, R. and Callaghan, O. 1979. Water pollution and diseases in fish (an epizostology survey). *J. Enviromen. Toxicol.*, 2: 917-925.
- Brown, M.D., Thomas D. and Kay, B.H. 1998. Acute toxicity of slected pesticides to the Pacific blue-eyes, *Pseudomugil signifer* (Pisces). *J. of the Am. Mosq. Control Assoc.*, 14: 463-466.
- Buikema, L.A., Niederlehner, B.R. and Cairns, J.Jr. 1982. Biological Monitoring. Part IV- Toxicity testing. *Water Res.*,16: 239-262.
- Cortinas de Nava, C. 1990. Carciongenesis ambiental En: Curso básico de toxicología ambiental [L.A. Albert] Ed. OPS/Limusa Noriega. Cap., 3: 23-40.
- Crosskey, R.W. 1990. The natural history of black flies. Jhon Wiley & Sons. Chichester, England. 711 p.
- Davies, D.M. 1981. Predators upon black flies. In: M. Laird [ed.]Black flies: the future of biological methods in integrated control. Academic. Press. Inc. London. 139-158 p.
- Davies, D.M. 1991. Aditonal records upon black flies (Simuliidae:Diptera). *Bull. Soc. Vector. Ecol.*, 16: 256-268.
- Dirección General de Ecología. 1995. Plan de Ordenamiento Ecológico del Territorio del Estado de Baja California. Gobierno del Estado de Baja California.
- Djomo, J.E., Ferrier, V. and Békaert. 2000. Amphibian micronucleus test in vivo (jaylet test) to evaluate the genotoxicity of petrochemical waste waters. *Environ. Contam. Toxicol.*, 65:168-174.
- Feitelson, J.S., Payne, J. and Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Biotechnology*,10:271-275.
- Flores, M. 1991. Cultivo de trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* en piscicultura de agua dulce. Tesis. Universidad Católica Ssma. Concepción. 66 p.
- Fortin, C. Lapointe, D. and Charpentier, G. 1986. Susceptibility of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) fry to a liquid formulation of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* (Teknar®). Used for blackfly control. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43:1667-1670.
- Fox, G.A. 1994. Bioindicators as a measure of success for virtual elimination of persistent toxic substances. Report to the Virtual Elimination Task Force, International Joint Commission, Windsor, ON.

- Gaugler, R. and Finney, J.R. 1982. A review of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotype 14) as a biological control agent of black flies (Simuliidae). Misc. Publ. Entomol. Soc. Am., 12: 1-17.
- Gauthier, L., L'Haridon, J., Ferrier, V., Fernández, M. and Van der Gaga, M.A. 1994. In vivo detection of waste water and industrial effluent genotoxicity: Use of the Nest micronucleus test (Jaylet Test). Sci. Environ., 138: 249-269.
- Gibbs, K.E., Brautigan, F.C., Sttubs C.S. and Zibilske, L.M. 1986. Experimental applications of *B.t.i.* for larval black fly control: persistence and downstream carry, impact on nontarget invetrebrates and fish feeding. Maine Life Sci. Agric. Stn. Tech. Bull., 123: 1-25.
- Gómez-Arroyo, S. y Villalobos Pietrini, R. 1992. Respuesta citogenética Diferencial insecticidas Organofosforados obtenidas según el sistema de prueba. Memoria del II Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Mutagénesis, Carcinogénesis y teratogénesis Ambiental. 15-18 de Noviembre de 1992. Mazatlán, Sin. México.
- Hartley, S.E. and Home, M.T. 1985. Cytogenetic techniques in fish genetics. Journal of fish biology. 12:575-582.
- Heddle, J.A. 1989. Mutagenecity (New Horizons in Genetic Toxicology). Academic Press. New York. 435-456 pp.
- INEGI. 1995. Estudio Hidrológico del Estado de Baja California. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 1-180 pp.
- Jackson, K.J., Sweenney, B.W., Bott, L.T., Newbold. D. J. and Kaplan, A.L. 1994. Transport of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and Its Effects on Drift and Benthic Densities of Nontarget Macroinvertebrates in the Susquehanna River, Northern Pennsylvania. Can. J. Aquatic. Sci., 51:295-314.
- Kligerman, A.D. 1979. Cytogenetics methods for the detection of radiation-induced chromosome damage in aquatic organisms. In: "technical Report series No. 190: Methodology for Assessing impacts of Radioactivity on Aquatic Ecosystem." IAEA, Vienna. 349-367 pp.
- Kligerman, A.D. 1980. The use of organisms to detects mutagens that cause cytogenetics damage. In: "Radiation Effects on Aquatics Ecosystems." (N. Egami, ed.). Japan Sci. Oc. Press. Tokyo. 241-252 pp.
- Krayball, H.F. 1977. Global distribution of carcinogenic pollutants in water. Ann. N. Y. Acad.Sci., 298:20-30.

- Kreutzweiser, D.P., Holmes, S.B., Capell, S.S. and Eichenberg, D.C. 1992. Lethal and sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on aquatic insects in laboratory bioassays and outdoor stream channels. *Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 252-258.
- Lacey, L.A. and M.S. Mulla. 1990. Safety of *Bacillus thuringiensis* ssp. *Israelensis* and *Bacillus sphaericus* to nontarget organisms in the aquatic environment, p 169-188. In: M. Laird, L.A. Lacey y E.W. Davidson [ed.] Safety of Microbial insecticide. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Lambert, B. and Peferoen, M. 1992. Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis*. *BioScience*, 42: 112-121.
- Lee, Byung Mu and Geoffrey I. Scott. 1989. Acute Toxicity of Temephos, Fenoxycarb, Diflubenzuron, and Methoprene and *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* to the Mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 43:827-832.
- Loera, R. y Albert, L.A. 1990. La contaminación y el desarrollo de los plaguicidas sintéticos. En Albert, L. A. (Coord.) Los plaguicidas el ambiente y la Salud. Centro de Ecodesarrollo. 331 p.
- Longwell, A.C. 1976. "Chromosome Mutagenesis in Developing Mackerel Eggs Sampled from the New York Bight". NOAA Technical memorandum ERL MESA-7, Marine Ecosystems Analysis Program Office, Boulder, Colorado.
- Macek, K.J. 1980. Aquatic Toxicology: Fact or fiction? *Environ. Health Perspect.*, 34:159-163.
- Makino, S. 1956. A review of the chromosome number chromosomic in animals, Kokuryukan, Tokyo. Cited in: Chromosome cytology of the Osteichthyes. F.L.Roberts 1967. *Progre. Fish. Cult.* 29:75-83.
- Mason, R.D. and Lind, D.A. 1997. Statistical techniques in business and economics. Ed. IRWIN, 8th edition. Boston, USA. 872 p.
- Matsushima, T. and Sugimura, T. 1976. Experimental carcinogenesis in small aquarium fishes. *Prog. Exp. Tumor Res.*, 20: 357-379.
- McCann, J.E., Yamasaki, E., and Ames, B.N. 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsoma test: Assay of 300 chemicals. *Proc. N. Acad. Sci. U.S.A.*, 72: 5135-5139.

- Meadows, J., Gill, S.S. and Bone, L.W. 1990. *Bacillus thuringiensis* strains affect population growth of the free-living nematode *Turbatrix aceti*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 17: 73-76.
- Merritt, R.W., Walker, E.D., Wilzbach, K.W., Cummins and W.T. Morgan. 1989. A broad evaluation of *B.t.i* for black fly (Diptera: Simuliidae) control in a Michigan river: efficacy, carry and nontarget effects on invertebrates and fish. *J. of the Am. Mosq. Control Assoc.*, 5: 397-415.
- Morales, A. 1991. La tilapia en México. *Biología cultivo y pesquerías*. AGT EDITOR, S. A., México. 190 p.
- Nogusa, S. 1960. A comparative study of the chromosome in fishes, with particular consideration on the taxonomy and evolution. *Mem. Hyogo Univ. Agric.*, 3.
- Ohe, T., Ito, H. and Kawabuti, M. 1993. Genotoxicity of blue rayon extracts from river waters using sister chromatid exchange in cultured mammalian cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 25:293-297.
- Ohno, S., Stenius, C., Faisst, E. and Zenzes, M.T. 1965. Post-zygotic rearrangement in rainbow trout (*Salmo irridus* Gibbons). *Cytogenetics*, 4:117-129.
- Oka, I.N. and Pimentel, D. 1976. Herbicide (2,4 D) increases insects and pathogens pest on corn. *Science*, 193: 239-240.
- Oppermann, K. 1913. Die Entwicklung von Forelleneiern nach Befruchtung mit Raiumbestrahlten Samenfaden. *Arch. Mikrosk. Anat.*, 83: 307-323.
- Romero, E. 1996. Comunicación Personal. Empresa "Quimical de México".
- Pandrangni, R., Petras; Ralph, M. and Vrzoc, M. 1995. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bull head and carp. *Environ. Molec. Mut.*, 26: 345-356.
- Pimentel, D., Krummel, J., Gallahan, D., Hough, J., Merrill, A., Schreiner I., Vittum P., Koziol, F., Back, E., Yen, D. and Fiance, S. 1978. Benefits and Costs of Pesticide Use in U.S. Food Production. *BioScience*, 28.
- Programa de Desarrollo de la Ciudad de Ensenada, Gobierno del Estado de Baja California (1995).
- Rankin, G.M. and Dixon, G.D. 1994. Acute and Chronic Toxicity of Waterborne Arsenite to Rainbos Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51: 372-380.

- Restrepo, I. 1988. Naturaleza Muerta. Los plaguicidas en México. Edit. Andromeda. 236 p.
- Richardson, S.J. and Perrin, J.C. 1994. Effects of the Bacterial Insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) on a Stream Benthic Community. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 51:1037-1045.
- Rudolph, A., Yáñez, R. and Troncoso, L. 2001. Effects of exposure of *Oncorhynchus mykiss* to the water-accommodated fraction of petroleum hydrocarbons. Environ. Contam. Toxicol., 66: 400-406.
- S.A.R.H. 1991. Principales productos químicos aplicados en la zona. Documento no publicado.
- Schreck, B.C. and Moyle, B.P. 1990. Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA. p. 1-684.
- Secretaría de Pesca. 1994. Desarrollo científico y tecnológico del banco de genoma de tilapia. Convenio SEPESCA/UAM-I. México. 89 p.
- Siegel, J.P. 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticides. J. Invertebrate Pathology, 77:13-21.
- Siegel, J.P., Shaddock, J.A. and Szabo, J. 1987. Safety of the Entomopathogen *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for Mammals. J. Economic Entomology, 80: 717-723.
- Snarski, V.M. 1990. Interactions between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and fathead minnows, *Pimephales promelas* rafinesque, under laboratory conditions. Appl. Environ. Microbiol., 56: 2618-2622.
- Solberg, A.N. 1938. The susceptibility of *Fundulus heteroclitus* embryos to X-radiation. J. Exp. Zool., 78: 441-465.
- Sonstegard, R.A. 1977. Environmental carcinogenesis studies in fishes of the Great Lakes of North America. Ann. N.Y. Acad. Sci. 298,389-408.
- Sujburt, L., Kollar, G., Oellos G. and Ribari, L. 1993. Measuring the genotoxic potential in two drinking water resources of Budapest in Salmonella/microsome system. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 51: 249-355.

- Sumathi, M., Kalaiselvi, K., Palanivel, M. and Rajaguru, P. 2001. Genotoxicity of textile dye effluent of fish (*Cyprinus carpio*) measured using the comet assay. *Environ. Contam. Toxicol.*, 66: 407-414.
- Svardson, G. 1945. Chromosome studies on Salmonidae. Reports from the Swedish State Institute of Fresh Water Fishery research, 23: 1-151.
- Tousignant, M.E., Boisvert, J.L., and Chalifour, A. 1993. Loss of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Larvicidal Activity and Its Distribution in benthic Substrates and Hyporheic Zone of Stream. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: 443-451.
- Tsoi, R.M. 1970. Effects of nitrosomethyl urea and dimethyl sulfate on sperm on rainbow trout (*Salmo irideo* Gibb) and Peled (*Coregonus peled* Gmel.). *Dokl. Biol.Sci. (Engl. Trans.)*.189: 849-851.
- Tsoi, R.M. 1971. Effect of methyl sulfate on mutation frequency of genes S and n in the carp (*Cyprinus carpio* L.) *Dokl. Biol. Sci. (Engl. Trans.)*, 197: 197-200.
- Undeem, A.H. and Lacey, L.A. 1982. Field Procedures for the evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotype 14) against black flies (Simuliidae) and nontarget organisms in streams. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.*, 12: 25-30.
- Vega, G.S. y Reynaga O.J. 1990. Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Editorial Limusa. México. 727 p.
- Wilson R. and Crouch, C.A. 1987. Risk Assessment and Comparisons: An introduction. *Science*. 267-270 pp.
- Wipfli, S.M., Merritt, W.R. and Taylor, W.W. 1994. Low Toxicity of the Black Fly Larvacide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to early Stages of Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*), Brown trout (*Salmo trutta*) and Steelhead Trout (*Oncorhynchus mykiss*) following Direct and Indirect Exposure. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51:1451-1458.
- Younos, M.T. and Weigmann, L.D. 1988. Pesticides: a continuing dilemma. *Journal Water Pollution Control Federation*, 60:1199-1205.
- Zahn, K.R. 1991. *Ecotoxicology and the marine environment*. Abel, D.P. y Axiak V. (Editores). Ellis Horwood, New York. p.269.
- Zhong, Y., Feng, S.L., Luo, Y. Zhang, G.D. and Kong, Z.M. 2001. Evaluating the genotoxicity of surface water of Yangzhong city using the *Vicia faba* micronucleus test and the comet assay. *Environ. Contam. Toxicol.* 67:217-224.

Anexo

Interpretación de diferencias significativas

TRATAMIENTOS CONTROLES VS EXPERIMENTALES

DS ¹	CTRL VS EXPERIMENTALES BRANQUIAS/MITOSIS	CONCENTRACIÓN 5,000 ppm	EXPOSICIÓN HETEROPICNOSIS
Existen diferencias significativas, pero es debido a que el lote testigo presenta mayor número de heteropiconosis que el lote experimental, posiblemente esto ocurra en el estado basal de tales células, sin que el efecto observado sea ocasionado por el agente probado.			
No efecto			
DS ²	CONTROLES BRANQUIAS/MITOSIS	CTRL EXP. VS CTRL REC.	RECUPERACIÓN HETEROPICNOSIS
El efecto es provocado debido a que en la concentración de 5,000 ppm después de la exposición el lote control tiene valores diferentes de cero y el lote experimental es igual a cero, mientras que en todos los demás tratamientos comparados, tanto los lotes testigos como los experimentales son iguales a cero. Tal condición genera que existan diferencias significativas estadísticas, sin embargo no tienen una significancia biológica. Por lo tanto es posible que la presencia de heteropiconosis sea una condición normal en las células, pues se observan en los lotes controles y no en experimentales. Por lo tanto el agente no induce a la formación de heteropiconosis.			
No efecto			
DS ³	CTRL VS EXPERIMENTALES BRANQUIAS/MITOSIS	CONCENTRACIÓN 1,000 ppm	RECUPERACION INDICE MITOTICO
Existen diferencias significativas debido a que el lote experimental después de un tiempo de recuperación presenta mayor número de mitosis, que el lote testigo que posee un valor de cero. Tal vez el agente posee un efecto mitogénico, pues aún después de un tiempo de recuperación, se esperaría encontrar valores semejantes al lote control, sin embargo los valores son diferentes.			
Si efecto			
DS ⁴	CTRL VS EXPERIMENTALES BRANQUIAS/MN	CONCENTRACIÓN 10,000 ppm	EXPOSICIÓN INDICE MITOTICO
Existen diferencias significativas debido a que el lote experimental presenta valores de cero después de la exposición, lo que indica que las células no se están dividiendo por lo tanto el agente puede ser que tenga un poder citotóxico, puesto que las células han dejado de dividirse.			
Si efecto			
DS ⁵	CTRL VS EXPERIMENTALES BRANQUIAS/MN	CONCENTRACIÓN 5,000 ppm	RECUPERACIÓN HETEROPICNOSIS
Después del tiempo de recuperación el número de heteropiconosis es mayor en el lote experimental que en el testigo. El agente puede inducir a la heteropiconosis, o bien tal condición puede ser normal en las células, solo que después de la exposición tal efecto se magnifica.			
Si efecto			

DS ⁶	CONTROLES BRANQUIAS/MITOSIS	CTRL EXP. VS CTRL REC.	RECUPERACION HETEROPICNOSIS
Las diferencias significativas son debidas a que en la concentración de 5,000 ppm, el lote control presenta un valor significativamente mayor a cero y en todos los demás casos, los lotes controles y experimentales tienen valores de cero. Por lo tanto el efecto heteropícnótico es normal en las células y no es un efecto provocado por el agente.			
No efecto			
DS ⁷	CTRL VS EXPERIMENTALES TRACTO DIG./MN	CONCENTRACIÓN 10,000 ppm	EXPOSICIÓN INDICE MITOTICO
El agente tiene un efecto citotóxico debido a que el lote testigo se aprecia divisiones mitóticas y en el lote experimental no.			
Si efecto			
DS ⁸	CONTROLES	CTRL DE EXP. VS CTRL DE REC.	RECUPERACION HETEROPICNOSIS
Las diferencias significativas son debidas a que en la concentración de 5,000 ppm el lote control tiene un valor significativamente mayor a cero y en todos los demás casos los lotes controles y experimentales tienen valores de cero. Por lo tanto el efecto heteropícnótico es una condición normal en el las células y no es un efecto provocado por el agente.			
No efecto			
DS ⁹	CTRL VS EXPERIMENTALES TRACTO DIG./MN	CONCENTRACIÓN 5,000 ppm	RECUPERACION HETEROPICNOSIS
Las diferencias significativas son debidas a que en la concentración de 5,000 ppm el lote testigo tiene un valor significativamente mayor a cero y en todos los demás casos los lotes controles y experimentales tienen valores de cero. Por lo tanto el efecto heteropícnótico es normal en el las células y no es un efecto provocado por el agente.			
No efecto			

COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS POR CONCENTRACIÓN

DS ¹⁴	COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS TRACTO DIG./MN	1,000 VS 5,000 ppm	RECUPERACIÓN HETEROPICNOSIS
Las diferencias son estadísticas, pero no biológicas puesto que en la concentración de 1000 ppm tanto en lote testigo como experimentales, presenta valores de cero, en cambio en la concentración de 5000 ppm el lote testigo presenta valores diferentes de cero y el lote experimental presenta valores de cero. Al parecer la presencia de heteropiconosis aparenta ser una condición normal en células epiteliales de branquia y tracto digestivo. De la comparación de una concentración en la que los valores obtenidos tiene valores de cero contra contra que si tiene, se concluye que el agente no induce a la heteropiconosis .			
No efecto			
DS ^{15,16 y 17}	COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS TRACTO DIG./MN	1,000, 5,000, 10,000 ppm	EXPOSICIÓN HETEROPICNOSIS
Las diferencias significativas son debidas a que en la concentración de 1,000 ppm los lotes testigos y experimentales tienen valores diferentes de cero, en cambio en las concentraciones de 5000 y 10,000 ppm tanto el lote testigo como el experimental son igual a cero, por lo tanto en todas las comparaciones (15,16) presentan diferencias significativas y en 17 no existen. Al parecer la concentración de 1,000 ppm tiene un efecto de inducción a la heteropiconosis, puesto que el lote experimental presenta valores mayores que el lote testigo. En cambio en las otras dos concentraciones donde el lote testigo y experimental son iguales a cero, el agente no tiene ningún efecto en los organismos.			
Si efecto en la concentración de 1000 ppm			
DS ¹⁸	COMPARACIÓN TRATAMIENTOS TRACTO DIG./MITOSIS	1,000, 10,000, 5,000 ppm	EXPOSICIÓN INDICE MITÓTICO
A pesar de que no existen diferencias significativas en cada concentración, al comparar si existen diferencias significativas, puesto que en las concentraciones 1,000 y 5,000 ppm sólo los lotes controles presentan valores de cero, lo que significa que se encontraron células metafásicas, en cambio en la concentración de 10,000 ppm tanto lote testigo y experimental presentan valores de cero.			
El agente probado quizá tiene un efecto citotóxico en las concentraciones de 1,000 y 5,000 ppm, puesto que después de la exposición, las células han dejado de dividirse. Para la concentración de 10,000 ppm no se manifiesta ningún efecto.			
Si efecto, sólo en las concentraciones de 1,000 y 5,000 ppm			
DS ¹⁹	COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS TRACTO DIG./MITOSIS	10,000, 5,000 ppm	EXPOSICIÓN INDICE MITÓTICO
En este caso también las diferencias estadística coincide con una significancia biológica, sin embargo es notable en la concentración de 5,000 ppm, puesto que el lote control presenta valores diferentes de cero (mitosis antes de la exposición), en cambio en la concentración de 10,000 ppm tanto lote testigo y experimental tienen valores de cero, (no se cuantificaron mitosis antes y tampoco después de la exposición).			
Si efecto en la concentración 5,000 ppm			

DS ²⁰	COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS TRACTO DIG./MITOSIS	1,000, 5,000, 10,000 ppm	EXPOSICIÓN MN
Al parecer las diferencias son estadísticas que no coinciden con una significancia biológica, puesto que en las concentraciones de 5,000 y 10,000 ppm, los valores de los lotes controles son casi cero y en los experimentales son de cero. Por lo que al compararse con la concentración de 1000 ppm, donde los lotes testigo y experimental tienen valores de cero (casi iguales entre ellos 0.944 y 1.002). Lo obtenido es el efecto de comparar un tratamiento con valores diferentes de cero, contra otro que es casi cero, de ahí las diferencias significativas estadísticas. Para la concentración de 1,000 ppm al parecer no tiene efecto, pues no existen diferencia significativas dentro del mismo tratamiento., sin embargo se pudiera considerar un leve efecto del agente en la inducción a la formación de micronúcleos, pues es el lote experimental es ligeramente mayor que el lote control.			
Posible efecto			
DS ²¹	COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS TRACTO DIG./MITOSIS	1,000, 5,000 ppm	EXPOSICIÓN MN
La explicación es la misma que en el caso anterior debido a que se esta comparando las concentraciones de 1,000 vs 5,000 ppm. Al parecer las diferencias estadísticas, no coinciden con una significancia biológica, puesto que los valores de las concentraciones de 5,000 y 10,000 ppm los valores de casi cero, para los lotes control y experimental, que al compararse con la concentración de 1000 ppm donde lote testigo y experimental tienen valores de diferentes de cero (casi iguales entre ellos)por lo tanto al comparar un tratamiento con valores diferentes de cero contra otro que es casi cero, se obtienen diferencias significativas. Para la concentración de 1,000 ppm no tiene efecto, pues no existen diferencia significativas dentro del mismo tratamiento, sin embargo se pudiera considerar un leve efecto del agente en la inducción a la formación de micronúcleos, pues es el lote experimental es ligeramente mayor que el lote control.			
No efecto			
DS ²²	COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS TRACTO DIG./MN	1,000, 10,000, 5,000 ppm	EXPOSICIÓN INDICE MITÓTICO
Existen diferencias significativas entre todas las concentraciones debido a que cada concentración tiene efecto diferente. Analizando cada concentración en 1000 ppm los valores de los lotes testigos y experimental tienen valores de cero (no efecto del agente), en cambio en las concentraciones de 1000 y 5000 ppm los lotes testigos presentan valores diferentes de cero y los lotes experimentales son iguales a cero. El agente tiene un efecto citotóxico para las concentraciones probadas, puesto después de la exposicion no se observan mitosis, sin embargo se presentan en los lotes testigos.			
Si efecto citotóxico			
DS ²³	COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS TRACTO DIG./MN	1,000, 5,000 ppm	EXPOSICIÓN INDICE MITÓTICO
Las diferencias significativas son debidas a que la concentración de 5,000 ppm el lote testigo presenta valores diferentes de cero, pero el lote experimental son iguales a cero y en la concentración de 1,000 ppm tanto lote testigo como experimental presentan valores de cero, por lo tanto el agente tiene un efecto citotóxico para las concentración de 5,000 ppm, puesto que después de la exposicion no se observan mitosis, sin embargo se presentan en los lotes testigos			
Si efecto en la concentración 5,000 ppm			

DS ²⁴	COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS TRACTO DIG./MN	1,000 VS 10,000 ppm	EXPOSICIÓN INDICE MITÓTICO
Las diferencias significativas son debidas a que la concentración de 10,000 ppm, el lote control presenta valores diferentes de cero, pero el lote experimental son iguales a cero y en la concentración de 1,000 ppm tanto lote testigo como experimental presentan valores de cero, por lo tanto el agente puede tener un efecto citotóxico para la concentración de 10,000 ppm, puesto que después de la exposición no se observan mitosis, sin embargo se presentan en los lotes testigos			
Si efecto citotóxico en la concentración de 10,000 ppm			
DS ²⁵	COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS TRACTO DIG./MN	1,000 VS 5,000 ppm	RECUPERACIÓN HETEROPICNOSIS
Existen diferencias significativas debido a que en la concentración de 5,000 ppm el lote control presenta valores diferentes de cero y el lote experimental son iguales a cero, en cambio la concentración de 1000 ppm, tanto el lote testigo y experimental son iguales a cero. Las diferencias significativas son por la comparación de un tratamiento con valores de cero con otro que tiene valores diferentes de cero, sin embargo el que tiene valores diferentes de cero es el lote control. Por lo tanto el agente no induce a la heteropcnosis.			
No efecto			

COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS DE EXPOSICIÓN CONTRA RECUPERACIÓN

DS ²⁶	COMPARACIÓN EXP VS REC	5,000 ppm	BRANQUIAS MITOSIS	INDICE MITÓTICO
Las diferencias significativas posiblemente no son debidas por un efecto del agente, después de la exposición no se observa ningún efecto, el lote control tiene valores diferentes de cero y el lote experimental es igual a cero, en cambio después del tiempo de recuperación, ambos lotes presentan valores diferentes de cero sin que existan diferencias significativas entre los tratamientos.				
No efecto				
DS ²⁷	COMPARACIÓN EXP VS REC	5,000 ppm	BRANQUIAS MICRONÚCLEOS	MICRONUCLEOS
Las diferencias significativas se originan en la concentración de 5,000 ppm, en la cual, el lote testigo y el experimental, este último tiene mayor número en la frecuencia de micronúcleos que el lote testigo, al parecer ésta concentración tiene un efecto clastogénico, que es encubierto en la exposición pero después de un tiempo de recuperación el daño aún es evidente.				
Si efecto				
DS ²⁸	COMPARACIÓN EXP VS RECUP	5,000 ppm	TRACTO DIG. MICRONÚCLEOS	MICRONUCLEOS
Como en el caso anterior solo que en este caso, después de la exposición los lotes testigos y experimental tienen valores de cero y después de la recuperación tienen valores diferentes de cero (lote control con mayor número de micronúcleos, que en el lote experimental) por lo que las diferencias significativas son debidas a la comparación de dos tratamientos uno con valores mayores de cero y el otro con valores de cero, pero no es por efecto del agente probado, el cual no tiene poder para inducir a la formación de micronúcleos.				
No efecto				
DS ²⁹	COMPARACIÓN EXP. VS REC.	5,000 ppm	TRACTO DIG. MICRONÚCLEOS	MICRONÚCLEOS
Semejante a el caso anterior, sólo que después de la exposición los lotes controles y experimental tienen valores de cero y después de la recuperación tienen valores diferentes de cero (lote control, con mayor número de micronúcleos, que el lotes experimental), por lo tanto las diferencias significativas son debidas a la comparación de dos tratamientos uno con valores mayores de cero y otro con valores de cero, pero no es por efecto del agente probado, el cual no tiene poder para inducir.a la formación de micronúcleos				
No efecto				
DS ³⁰	COMPARACIÓN EXP VS REC.	5,000 ppm	TRACTO DIG. /MITOSIS	ÍNDICE MITÓTICO
Ocurre lo mismo que en el caso anterior solo que en este caso, después de la exposición los lotes control y experimental tienen valores de cero y después de la recuperación tienen valores diferentes de cero (lote control con mayor número de mitosis que el lotes experimental, el agente puede tener un efecto citotóxico puesto que disminuyo la tasa de división celular.				
Si efecto				
DS ³¹	COMPARACIÓN EXP. VS REC.	1,000 PPM	TRACTO DIG. /MITOSIS	ÍNDICE MITÓTICO
Las diferencias significativas son similares al caso anterior, después de la exposición los lotes control y experimental tienen valores de cero y después de la recuperación tienen valores diferentes de cero (lote control con mayor número de mitosis que el lote experimental, el agente puede tener un efecto citotóxico puesto que disminuyo la tasa de división celular.				
Si efecto				

COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS EXPOSICIÓN CONTRA RECUPERACIÓN POR ÓRGANOS

DS ³²	COMPARACIÓN ENTRE ORGANOS BRANQUIA/MITOSIS-TRACTO DIG./MITOSIS	5,000 ppm	HETEROPICNOSIS EXPOSICIÓN
Se está comparando un tratamiento donde el lote control es diferente de cero y el lote experimental es igual a cero contra el otro tratamiento, donde el lote control y experimental tienen valores de cero. Por lo tanto al estar comparando dos tratamientos en el que uno tiene valores de cero contra el otro que tiene valores diferentes, se obtienen significativas estadísticas, pero no biológicas, puesto que el lote donde los valores son diferentes de cero, el lote testigo tiene valores mayores para el porcentaje de heteropiconosis que el lote experimental. Por lo tanto el agente no tiene poder inductor para heteropiconosis.			
No efecto			
DS ³³	COMPARACIÓN ENTRE ORGANOS BR/MITOSIS -INTS/MITOSIS	10,000 ppm	HETEROPICNOSIS EXPOSICIÓN
El caso es semejante al anterior con la diferencia en que el lote experimental y testigo en el tratamiento el primer caso tiene valores diferentes de cero y en el segundo caso son iguales a cero. Por lo tanto al estar comparando dos tratamientos en el que uno tiene valores de cero contra el otro que tiene valores diferentes de cero, se obtienen diferencias significativas estadísticas, pero no coinciden con una significancia biológica, puesto que en lote donde los valores son diferentes de cero, el lote control tiene valores mayores para el porcentaje de heteropiconosis que el lote experimental. Por lo tanto el agente no tiene poder inductor para heteropiconosis			
No efecto			
DS ³⁴	COMPARACIÓN ENTRE ORGANOS BR/CROMOSOMAS-INTS/CROMOSOMAS	1,000 ppm	INDICE MITÓTICO EXPOSICIÓN
Aparentemente la concentración de 1000 ppm es más perjudicial para los peces puesto que los lotes controles y los experimentales tienen valores diferentes de cero, sin embargo el lote experimental es mayor que el lote control, en el primer tratamiento para la obtención de mitosis en branquias, en cambio en el tratamiento para obtener mitosis en tracto digestivo, el lote control es casi cero y el lote experimental es igual a cero. Las diferencias significativas son debidas a que se está comparando un tratamiento con valores diferentes de cero con otro que es casi cero. Las diferencias significativas son estadísticas pero no coinciden con una significancia biológica, puesto que en el tratamiento de branquias, a pesar que el lote experimental tiene mayor valor en el porcentaje de mitosis, no existe diferencias significativas dentro del mismo tratamiento. Por lo tanto el agente no tiene un efecto mitogénico u de otro tipo entre los órganos estudiados.			
No efecto			
DS ³⁵	COMPARACIÓN ENTRE ORGANOS BR/MITOSIS-TRACTO DIG./MITOSIS	10,000 ppm	MICRONÚCLEOS EXPOSICIÓN
Ocurre exactamente lo mismo que en el caso anterior aparentemente la concentración de 10,000 ppm es más dañina para los peces puesto que los lotes control y experimental tienen valores diferentes de cero, sin embargo el lote experimental es mayor que el lote testigo en el tratamiento de branquias para obtener cromosomas, en cambio en el tratamiento de tracto digestivo para obtener cromosomas el lote testigo es casi cero y el lote experimental es igual a cero. Las diferencias significativas son debidas a que se está comparando un tratamiento con valores diferentes de cero con otro que es casi cero. Las diferencias significativas son estadísticas pero no coinciden con una significancia biológica, puesto que en el tratamiento para obtener cromosomas, a pesar que el lote experimental tiene mayor valor en el porcentaje de mitosis no, existe diferencias significativas dentro del mismo tratamiento, por lo tanto el agente no tiene un efecto clastogénico entre los órganos estudiados.			
No efecto			

DS ³⁶	COMPARACIÓN DE ORGANOS BRANQUIAS/MITOSIS-TRACTO DIG./MITOSIS	1,000 ppm	INDICE MITÓTICO RECUPERACIÓN
<p>Aparentemente el agente tiene un efecto en el tratamiento aplicado a branquia para obtener cromosomas, después del tiempo de recuperación, puesto que se eleva el número de mitosis (efecto mitogénico). Sin embargo las diferencias son significativas se obtienen de comparar un tratamiento con valores diferentes de cero (branquia/mitosis), sólo el lote experimental, con otro que tiene valores de cero (tracto dig./mitosis) tanto para el lote testigo como para el experimental. Por lo que tanto el agente puede afectar mas al tejido epitelial de branquias en comparación de tracto digestivo.</p>			
Si efecto en branquia			
DS ³⁷	EXPOSICIÓN-RECUPERACION BRANQUIAS/MN-TRACTO DIG. /MN	1,000 ppm	INDICE MITÓTICO
<p>Las diferencias estadísticas, no coinciden con una significancia biológica, puesto que en los dos tratamientos comparados. El tratamiento branquia/micronúcleos presenta valores semejantes 0.62 y 0.65 lote testigo y experimental respectivamente, por lo que no existen diferencias significativas, en cambio en el otro tratamiento, tracto dig./micronúcleos, tanto lote testigo y experimental tienen valores de cero. Por lo cual las diferencias significativas son debidas a la comparación de un lote con valores diferentes de cero, contra otro que tiene valores de cero. Por lo tanto el agente no tiene un efecto mitogénico o citotóxico.</p>			
No efecto			
DS ³⁸	EXPOSICIÓN-RECUPERACION BRANQUIA/MITOSIS TRACTO DIGESTIVO /MITOSIS	5,000 ppm	HETEROPICNOSIS
<p>Las diferencias son estadísticas pero no biológicas, puesto que en los dos tratamientos comparados los lotes controles, tienen valores mayores que los lotes experimentales, por lo tanto el agente no tiene un efecto para la inducción de heteropicnosis.</p>			
No efecto			

DS ³⁹	BRANQUIAS/MN TRACTO DIG./MN	10,000 ppm	HETEROPICNOSIS EXPOSICIÓN
------------------	--------------------------------	------------	------------------------------

Las diferencias estadísticas no coinciden con significancia biológica, puesto que en los dos tratamientos comparados, los lotes testigo y experimental del primer tratamiento tienen valores semejantes 0.14 y 0.19 respectivamente donde no existen diferencias significativas, en cambio en el otro tratamiento tanto lote testigo y experimental tienen valores de cero. Por lo cual las diferencias significativas son debidas a la comparación de un lote con valores de cercano a cero con otro que tiene valores de cero. Por lo tanto el agente no tiene un efecto para la inducción a la heteropicosis.

No efecto

DS ⁴⁰	BRANQUIA/MN – TRACTO DIG./MN	10,000 ppm	INDICE MITÓTICO EXPOSICIÓN
------------------	------------------------------	------------	-------------------------------

Las diferencias son significativas debido a que se está comparando el primer tratamiento donde el lote testigo es diferente de cero y el lote experimental también es diferente de cero, contra otro donde el lote testigo con valores diferentes de cero para el lote control y el lote experimental es igual a cero. Los lotes controles tienen valores mayores que los lotes experimentales.

Al parecer el agente tiene un efecto citotóxico pues los lotes controles tienen mayor número de mitosis que los lotes experimentales después de ser expuestos, lo que indica que las células dejaron de dividirse.

En el tratamiento las células epiteliales de tracto digestivo son más sensible al agente probado que las de branquias puesto que después de la exposición en las células de tracto digestivo no se detectan mitosis.

Si efecto en tracto digestivo después de la exposición

DS ⁴¹	BRANQUIA/MN – TRACTO DIG./MN	5,000 ppm	HETEROPICNOSIS RECUPERACIÓN
------------------	------------------------------	-----------	--------------------------------

El agente tiene un efecto inductor de heteropicosis para el primer tratamiento, en el que existen diferencias significativas y donde el lote experimental tiene valores mayores que el lote testigo. En cambio en el otro tratamiento, donde también existen diferencias significativas, el lote testigo tiene valores diferentes de cero y el lote experimental tiene valores de cero, después de un tiempo de recuperación. Lo que indica que los organismos se recuperaron después de la exposición, por lo tanto el agente afecta más a la células epiteliales de branquias que las del tracto digestivo en cuanto a la inducción de heteropicosis.

Si efecto en branquias y tracto digestivo después de la recuperación.

DS ³⁹	BRANQUIAS/MN TRACTO DIG./MN	10,000 ppm	HETEROPICNOSIS EXPOSICIÓN
Las diferencias estadísticas no coinciden con significancia biológica, puesto que en los dos tratamientos comparados, los lotes testigo y experimental del primer tratamiento tienen valores semejantes 0.14 y 0.19 respectivamente donde no existen diferencias significativas, en cambio en el otro tratamiento tanto lote testigo y experimental tienen valores de cero. Por lo cual las diferencias significativas son debidas a la comparación de un lote con valores de cercano a cero con otro que tiene valores de cero. Por lo tanto el agente no tiene un efecto para la inducción a la heteropícnosis.			
No efecto			
DS ⁴⁰	BRANQUIA/MN - TRACTO DIG./MN	10,000 ppm	INDICE MITÓTICO EXPOSICIÓN
Las diferencias son significativas debido a que se está comparando el primer tratamiento donde el lote testigo es diferente de cero y el lote experimental también es diferente de cero, contra otro donde el lote testigo con valores diferentes de cero para el lote control y el lote experimental es igual a cero. Los lotes controles tienen valores mayores que los lotes experimentales. Al parecer el agente tiene un efecto citotóxico pues los lotes controles tienen mayor número de mitosis que los lotes experimentales después de ser expuestos, lo que indica que las células dejaron de dividirse. En el tratamiento las células epiteliales de tracto digestivo son más sensible al agente probado que las de branquias puesto que después de la exposición en las células de tracto digestivo no se detectan mitosis.			
Si efecto en tracto digestivo después de la exposición			
DS ⁴¹	BRANQUIA/MN - TRACTO DIG./MN	5,000 ppm	HETEROPICNOSIS RECUPERACIÓN
El agente tiene un efecto inductor de heteropícnosis para el primer tratamiento, en el que existen diferencias significativas y donde el lote experimental tiene valores mayores que el lote testigo. En cambio en el otro tratamiento, donde también existen diferencias significativas, el lote testigo tiene valores diferentes de cero y el lote experimental tiene valores de cero, después de un tiempo de recuperación. Lo que indica que los organismos se recuperaron después de la exposición, por lo tanto el agente afecta más a las células epiteliales de branquias que las del tracto digestivo en cuanto a la inducción de heteropícnosis.			
Si efecto en branquias y tracto digestivo después de la recuperación.			