

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS



**"EFECTOS TÓXICOS Y GENOTÓXICOS DEL FUNGICIDA
BENLATE EN LOS PECES MOSQUITO *Gambusia affinis*
Y EL PEZ ESPADA *Xiphophorus helleri*"**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL
GRADO ACADÉMICO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

EN MANEJO DE ECOSISTEMAS DE ZONAS ÁRIDAS

QUE PRESENTA

BERNARDINO DE JESÚS ORTIZ BARRÓN

Ensenada, Baja California, México

Septiembre de 2001



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIA

"EFECTOS TÓXICOS Y GENOTÓXICOS DEL FUNGICIDA
BENLATE® EN LOS PECES MOSQUITO *Gambusia affinis*
Y ESPADA *Xiphophorus helleri*"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL
GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

EN MANEJO DE ECOSISTEMAS DE ZONAS ÁRIDAS

PRESENTA

APROBADO POR:



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



Dr. Gorgonio Ruiz Campos

Ensenada Baja California



M.C. Jorge Alaniz García

Septiembre de 2001

A Ana, Francisco y Ernesto y Fam..
Sin su sincero apoyo dificilmente
hubiera podido culminar esta meta.
Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Baja California, quien a través del personal docente, personal administrativo y demás, que la conforman, siempre estuvieron dispuestos a colaborar, en la medida de sus facultadas, con este proyecto que hoy, por fin, llegó a su termino.

A Fish and Wildlife Service de E.U. por la beca otorgada para llevar acabo este trabajo.
Gracias.

Así también deseo agradecerle a mi director de tesis, Dr. Carlos Márquez Becerra, por el apoyo brindado en forma de enseñanzas, críticas y comentarios, siempre propositivos, que siempre me hizo. Al Dr. Gorgonio Ruiz por la ayuda prestada en el análisis del agua, así como de equipo de pesca de invaluable utilidad, y por los acertados comentarios a este escrito. Al M.C. Jorge Alaniz le agradezco su camaraderia y ayuda en las técnicas de captura y transporte del material biológico utilizado, y los tips de los mejores sitios de captura.

A los Drs. Meredith Gould, José Luis Stephano, Francisco Correa y Victor Salceda por la confianza depositada en este proyecto.

A todos ellos gracias

RESUMEN

Se evaluó la posibilidad de utilizar a los peces mosquito *Gambusia affinis* y espada *Xiphophorus helleri* (ambas especies de agua dulce) como biomonitores en estudios *in situ* o *ex situ* de ecosistemas acuáticos con grave perturbación antropogénica. Se utilizó el fungicida Benlate® por su amplia utilización, y el conocimiento que se tiene de la capacidad que posee de inducir daño (tóxicos y genotóxicos) en especies para las que originalmente no se diseñó. Se utilizaron diferentes concentraciones (1-500 mg/L), en siete experimentos estáticos. Se determinó el porcentaje de sobrevivencia en los tratamientos, y el daño citotóxico y genotóxico producido. La citotoxicidad (necrosis) se estimó analizando muestras de sangre periférica. El daño genotóxico se determinó analizando la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos. Ambos estudios se realizaron con sangre periférica; para el análisis se utilizó microscopio óptico.

El análisis de los resultados reveló diferencias interespecíficas en los niveles de respuesta presentados por ambas especies. Los peces mosquito *Gambusia affinis* fueron más sensibles a Benlate®, ya que se produjo mayor mortalidad que en el pez espada *Xiphophorus helleri* en las diferentes concentraciones utilizadas. A nivel intraespecífico también se encontraron diferencias, ya que hubo un marcado contraste entre los niveles de sobrevivencia de los peces mosquito nacidos en cautiverio y los peces mosquito silvestres; los nacidos en cautiverio presentaron mayor sobrevivencia. El índice de citotoxicidad, expresado en frecuencia de células necróticas, no fue significativo en ninguno de los experimentos efectuados; en cambio en el índice de daño genotóxico (micronúcleos) en eritrocitos periféricos del pez espada, reveló una relación dosis-respuesta positiva. En los peces mosquito no hubo diferencias significativas con respecto a los controles en la producción de micronúcleos, aunque las concentraciones analizadas fueron menores que las de los peces espada. El daño observado no se correlacionó con ningún de los parámetro fisicoquímicos analizados; éstos tendieron a permanecer mas o menos constantes desde el inicio hasta el final de los experimentos efectuados.

ÍNDICE

I.	Introducción	1
II.	Hipótesis	7
III.	Objetivos	8
IV.	Importancia del estudio	9
V.	Antecedentes	10
VI.	Material y Métodos	38
VII.	Resultados	48
VIII.	Discusión	93
IX.	Conclusiones	113
X.	Bibliografía	116
XI.	Apéndice. Notas de la historia de vida de los peces mosquito <i>G. affinis</i> y espada <i>X. helleri</i>	123

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
1. Gráfica del comportamiento motriz de los peces mosquito <i>Gambusia affinis</i> en un experimento de toxicidad.	49
2. Gráfica de los parámetros fisicoquímicos medidos al inicio y al final del segundo experimento con el pez mosquito <i>Gambusia affinis</i> .	52
3. Curvas de toxicidad del experimento 1 con el pez mosquito <i>Gambusia affinis</i> sometido a cuatro concentraciones del fungicida Benlate®.	54
4. Intervalos de confianza del tiempo de sobrevivencia de los peces durante el experimento 1 con el pez mosquito <i>Gambusia affinis</i> .	55
5. Líneas probit del experimento 1 con el pez mosquito <i>Gambusia affinis</i> .	57
6. Experimento de toxicidad 2 con el pez mosquito <i>Gambusia affinis</i> sometido a 5 concentraciones del fungicida Benlate®.	59
7. Intervalos de confianza del tiempo de sobrevivencia de los peces durante el experimento 2 con el pez mosquito <i>Gambusia affinis</i> .	61
8. Cálculo de la CL50 por el método semigráfico.	62
9. Líneas probit de los diferentes tratamientos del experimento 2 con el pez mosquito <i>Gambusia affinis</i>	63
10. Curvas de toxicidad del experimento 3 con el pez mosquito <i>Gambusia affinis</i> sometidos a seis diferentes concentraciones del fungicida Benlate®.	67
11. Intervalos de confianza al 95% del experimento 3 con el pez mosquito <i>Gambusia affinis</i> .	69
12. Líneas probit de los diferentes tratamientos del experimento 3 con <i>Gambusia</i> .	71

13. Curvas de toxicidad del experimento 4 con el pez <i>Gambusia</i> .	74
14. Intervalos de confianza del experimento 4 con <i>Gambusia</i> .	75
15. Lineas probit del cuarto experimento con <i>Gambusia</i> .	76
16. Curvas de toxicidad del experimento 5 con <i>Gambusia</i> .	78
17. Intervalos de confianza al 95% del quinto experimento.	79
18. Curvas de toxicidad del experimento 6 con el pez espada <i>Xiphophorus helleri</i> sometidos a 5 diferentes concentraciones del fungicida Benlate®.	81
19. Intervalos de confianza al 95% del sexto experimento con el pez espada <i>Xiphophorus helleri</i> .	82
20. Cálculo de la CL50 por interpolación probit.	83
21. Intervalos de confianza del experimento 7 con el pez espada <i>Xiphophorus helleri</i> .	86
22. Regresión lineal de la frecuencia media de micronúcleos en los seis diferentes tratamientos y el control del experimento siete con el pez espada <i>Xiphophorus helleri</i> .	87
23. Frecuencia media de micronúcleos e intervalos de confianza al 95% del experimento 7 con <i>X. helleri</i> .	91
24. Frecuencia media de necrosis e intervalos de confianza al 95% del experimento 7 con <i>X. helleri</i> .	92
25. Eritrocitos normales del pez mosquito <i>Gambusia affinis</i> .	93
26. Contraste entre un eritrocito normal y un eritrocito con micronúcleo.	93
27. Núcleo necrótico.	94
28. Núcleo necrótico con cromatina reticulada	94
29. Foto del pez mosquito <i>Gambusia affinis</i> .	126
30. Foto del pez espada <i>Xiphophorus helleri</i> .	128

LISTA DE TABLAS

I.	Otras líneas de investigación con peces	17
II.	Tiempo y frecuencia de las exposiciones	22
III.	Procesos que enfrentan los pesticidas en el medio ambiente	22
IV.	Descripción técnica de Benlate®	25
V.	Sumario de toxicidad Aguda de Benlate	27
VI.	Comparación de un pez bioindicador ideal contra las especies utilizadas en este trabajo	38
VII.	Listado de los experimentos llevados a cabo.	47
VIII.	Calculo de los límites de confianza al 95% por el método de Lithfield-Wilcoxon	64
IX.	Prueba de Dunnett	70
X.	Prueba de Dunn	89

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas prístinos tienden a desaparecer en nuestro planeta. La contaminación, la sobreexplotación de los recursos, y el aumento de la población se han señalado como las principales causas de este fenómeno. Las consecuencias de éstos desequilibrios son manifiestas, y alcanzan una proporción global: calentamiento progresivo del planeta, fenómeno principalmente asociado al consumo de hidrocarburos y la pérdida de biodiversidad. Ambos problemas se han presentado, en buena medida, como consecuencia del aumento progresivo de la población, ya que de forma siempre creciente el hombre ha ido requiriendo de espacios mayores para obtener la energía, vivienda, crianza de animales y cultivos. Aunado a los problemas antes citados, el hombre moderno se enfrenta a enfermedades "nuevas", o poco conocidas; lo paradójico del caso es que algunos conocedores han señalado como una de las causas más probables de este fenómeno los desajustes ecológicos observados.

Probablemente de todos los factores de desequilibrio conocidos, los relacionados con la producción de los alimentos son los que más controversias han generado, destacando principalmente el caso de los pesticidas, ya que bajo los actuales esquemas de

producción de alimentos es difícil prescindir de ellos, aunque se desee. Es paradójico que por una parte los pesticidas han contribuido a la solución de problemas básicos (alimentación y control de algunas enfermedades infecciosas), pero por otra parte son responsables de algunos de los desequilibrios ecológicos más importantes, con consecuencias para la salud humana y de otros organismos.

Aunque el uso de plaguicidas no es reciente, el auge mayor ocurrió durante la segunda guerra mundial. Entonces los pesticidas se consideraron como un apoyo a los problemas de alimentación y algunos problemas de salud, sobre todo en aquellas enfermedades que se sabía requerían de vectores para su propagación, en donde si se elimina el vector se controlaba la enfermedad, como ejemplo se tienen a la fiebre amarilla, la enfermedad del sueño y la peste. Aunque esta apreciación no carece de razón, durante los años sesentas la confianza en los pesticidas decreció enormemente, sobre todo en los Estados Unidos, al hacerse públicas algunas denuncias sobre los efectos negativos de los pesticidas, especialmente aquellas que mencionaban que algunos pesticidas eran capaces de alterar las cadenas alimenticias; posteriormente fueron caracterizados los efectos a un nivel intraespecífico e individual, observándose que incluso dentro de un mismo organismo podían presentarse efectos distintos como alteraciones en el ciclo de vida y en la reproducción.

Al igual que toda sustancia química, los pesticidas están sujetos a las leyes fisicoquímicas que rigen al resto de las sustancias, por lo que no escapan a modificaciones ambientales (pH, temperatura, dureza, degradación microbiana, etc.); algunos de éstos fenómenos influyen directamente en la toxicidad y permanencia de un pesticida, sien-

do capaces de reducir o aumentar su toxicidad, haciendolos mas o menos biodisponibles. De la biodisponibilidad de un pesticida depende que éste sea capaz de causar perjuicios en los ecosistemas. Muchos de los primeros pesticidas, y sus metabolitos, eran altamente refractarios a los factores fisicoquímicos implicados en la degradación natural. Uno de los primeros efectos negativos observados fue el de la resistencia progresiva a los pesticidas, ya que cada vez se requería de mayores dosis para eliminar los organismos indeseados. Otro fenómeno interesante descubierto fue el de la bioamplificación, es decir, el aumento progresivo de las concentraciones de un pesticida a lo "largo" de una cadena alimenticia. Hoy se considera que muchos de éstos efectos negativos observados se hubieran evitado si se hubieran realizado las pruebas necesarias a corto, mediano y largo plazo, antes de introducir al mercado a algunos pesticidas, para, con esa información, determinar con un margen razonable de seguridad las condiciones bióticas y abióticas que determinan que una sustancia benéfica se convierta en perjudicial.

Pese al conocimiento de los efectos colaterales a la utilización de pesticidas, aún no es posible eliminar su uso bajo los actuales esquemas de producción masiva de alimentos, sobre todo en aquellos agrosistemas en donde se cultivan plantas exóticas que no tienen la resistencia a las plagas locales, por lo que ponen en peligros su productividad; lo mismo sucede en algunas regiones en donde aún siguen siendo un problema algunas enfermedades infecciosas graves. Debido a esta situación, y las voces que se han levantado en contra del uso abusivo de los pesticidas, los fabricantes trabajan constantemente en la introducción de nuevos productos "mejorados," la mejora generalmente consiste en el diseño de compuestos con una mayor especificidad, es decir que solamente

eliminen a las plagas, y presentan un menor tiempo de bioactividad (biodegradables o altamente lábiles a los factores ambientales), es decir que permanezcan el menor tiempo posible en el ambiente.

Una herramienta fundamental para generar un mayor conocimiento de los pesticidas se basa en la utilización de bioindicadores, que son organismos de los que se cuenta con amplios conocimientos biológicos y tienen relevancia ecológica. Con ello, el investigador es capaz de sacar inferencias, con cierto margen de seguridad del comportamiento de la sustancia estudiada; cabe mencionar que los resultados obtenidos no son directamente extrapolables a otras especies, sin embargo el valor de dichos organismos radica en el hecho de que pueden ser utilizados como puntos de referencia para establecer comparaciones y generar bases de datos en donde se describen los niveles críticos de toxicidad que afectan la viabilidad, sobrevivencia, y efectos a nivel intraespecíficos e interespecíficos.

En nuestro país en general, y en Baja California en particular, se utilizan muchos pesticidas. No todos son considerados como peligrosos para la salud, sin embargo, cabe mencionar que casi todos se venden con poca o ninguna restricción, lo que implica cierto riesgo para quienes lo manejan o para los sitios en donde se les aplica. El fungicida Benlate® es un buen ejemplo de lo anterior, ya que se vende sin restricción; el problema es que algunas investigaciones llevadas a cabo con este fungicida, lo asocian con la producción de cáncer en humanos expuestos, así como de animales de laboratorio.

Considerando la problemática que ofrecen los pesticidas en general, se decidió investigar la potencialidad de ser utilizados como bioindicadores dos especies de peces

no nativos de Baja California: el pez mosquito *Gambusia affinis* y el pez espada *Xiphophorus helleri* sometidos a diferentes concentraciones del fungicida Benlate®, para determinar los niveles de sobrevivencia que ofrecían ambas especies, así como determinar algunos de los probables efectos genotóxicos en eritrocitos de estos peces.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los pesticidas han contribuido mucho a paliar el problema de la producción de alimentos, sin embargo, desde hace años que se ha comenzado a ver en ellos una arma de dos filos: por un lado ayudan y por el otro perjudican. En este sentido, se han abierto dos frentes de lucha: los que favorecen su uso mencionan que generalmente cuando se ha incurrido en daños sobre el medio es por el mal uso, pero que bien utilizados resultan inócuos para el medio ambiente, y la contraparte aduce que la mayoría de los pesticidas carecen de vida corta y especificidad.

Respecto al primer argumento cabe mencionar que muchos de los pesticidas que se utilizan actualmente han sido "diseñados" para tener un efecto directo sobre las especies "problema" y perdurar durante un corto tiempo en el medio ambiente. Para los detractores, no es mucho lo que se ha avanzado con los pesticidas ya que muchos de ellos —sino es que todos— son capaces de provocar algún tipo de daño en organismos para los que no estaban, inicialmente, destinados.

El fungicida Belate® es considerado por sus fabricantes como altamente específico; sin embargo, algunas investigaciones lo han señalado como dañino para otros organismos eucariotes diferentes a los hongos. El caso de Benlate® remarca la impor-

tancia que tiene el conocimiento del mayor número de aspectos relacionados con los peligros potenciales del uso generalizado de un pesticida cualquiera; por ejemplo los casos de exposición prolongada, aún en dosis muy pequeñas. En este sentido son de mucha utilidad de especies bioindicadoras ya que, al ser conocido en ellas los niveles de respuesta, permiten determinar si los niveles encontrados en algún sitio representan algún riesgo.

HIPÓTESIS

Hipótesis General

- H_0 = El fungicida Benlate® no produce ningún efecto en la sobrevivencia, ni en los eritrocitos, de los peces mosquito *Gambusia affinis* y espada *Xiphophorus helleri*.
- H_1 = El fungicida Benlate® si tiene efectos negativos en la sobrevivencia y en los eritrocitos de los peces mosquito *Gambusia affinis* y espada *Xiphophorus helleri*.

Hipótesis particulares:

1. Pruebas de toxicidad aguda

- H_0 = Los peces mosquito *Gambusia affinis* y espada *Xiphophorus helleri* presentan una respuesta toxicológica semejante al fungicida Benlate®.
- H_1 = Los peces mosquito *Gambusia affinis* y espada *Xiphophorus helleri* presentan una respuesta diferente ante el fungicida Benlate®.

2. Efectos del fungicida Benlate® en los eritrocitos de ambas especies.

- H_0 = El fungicida Benlate® no produce ningún efecto citotóxico en los eritrocitos de los peces mosquito *Gambusia affinis* y espada *Xiphophorus helleri*.
- H_1 = El fungicida Benlate® si es capaz de producir efecto(s) citotóxicos cuantificables en los eritrocitos de ambas especies.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la utilidad de los peces mosquito *Gambusia affinis* y espada *Xiphophorus helleri* como biomonitores de pesticidas.

Objetivos particulares:

1. Determinar la concentración letal CL50 del fungicida Benlate® en los peces mosquito *Gambusia affinis* y espada *Xiphophorus helleri*.
2. Someter a diferentes dosis subletales a ambas especies para estimar los probables efectos genotóxicos o citotóxicos que el fungicida Benlate® puede provocar en los eritrocitos del pez mosquito *Gambusia affinis* y del pez espada *Xiphophorus helleri*.

Importancia del estudio

Algunos estudios llevados a cabo con el fungicida Benlate® en especies para las que originalmente no se diseñó, han puesto de manifiesto que su uso conlleva problemas de salud y, en casos extremos, al cáncer y la muerte. Sin embargo, en otros estudios, especialmente los que ha llevado a cabo la compañía Dupont, fabricante de Benlate®, lo considera como uno de los pesticidas de uso más seguro. Por ejemplo mencionan que Benlate® únicamente es capaz de provocar daños graves si es aplicado en concentraciones más allá de las recomendadas por el fabricante.

Aunque Benlate® no es de aplicación acuática, no es raro, al igual que otros pesticidas, que llegue a los cuerpos de agua gracias a fenómenos de escurrimiento y drenaje; esto representa un riesgo para la salud de los ecosistemas acuáticos ya que muchos pesticidas mantienen su bioactividad mucho tiempo después de su aplicación. Aunque el presente trabajo no se llevó a cabo *in situ*, se consideró conveniente conocer de antemano las concentraciones a las que Benlate® es capaz de producir efectos letales y subletales en los eritrocitos de los peces mosquito *Gambusia affinis* y espada *Xiphophorus helleri* en condiciones de laboratorio.

Las dos especies utilizadas en el presente trabajo son introducidas en Baja California, por lo que la presente investigación no afectó de manera directa a ninguna especie nativa; por el contrario, consideramos que la extracción de los peces para esta investigación probablemente contribuyó, en alguna medida, a mitigar cualquier efecto negativo que probablemente provocan estas dos especies.

ANTECEDENTES

BIOMONITOREO

El biomonitoreo fue definido originalmente como la medición de fluidos, células, tejidos u otras variables para establecer la presencia y magnitud de los efectos de un estresante. Una definición más moderna incluye la caracterización de las respuestas a nivel de individuo, población, o comunidad (Adams 1990).

El biomonitoreo no es nuevo, ya desde la antigüedad, los mineros colgaban jaulas con aves en el interior de las minas para detectar los gases tóxicos (Root 1990). Actualmente, el biomonitoreo es diferente, ya que se ha constituido en una área multidisciplinaria (Lower y Kendall 1990), que requiere conocer de antemano dos cosas: si los resultados del biomonitoreo sirvan para diagnóstico o para para estimar riesgos (Basten 1998).

A nivel de ecosistema, el biomonitoreo tiene dos premisas básicas: 1) conocer los efectos del estrés agudo, el cual se caracteriza por un súbito inicio, con rápido incremento en intensidad, pero de corta duración; 2) conocer el efecto del estrés crónico, el cual consiste en una perturbación de baja intensidad, pero de gran duración, o bien con

eventos repetidos en el tiempo (Kotelevtsev *et al.* 1994).

A nivel de organismo la premisa básica del biomonitorio es que los organismos son sujetos susceptibles al sometimiento de condiciones controladas, o conocidas, de tal manera que cualquier cambio en la fisiología o comportamiento es posible registrarla. (Balwin *et al.* 1994).

Para conocer los efectos sobre los individuos, es necesario hacer uso de bioensayos, durante una parte o todo del ciclo de vida del organismo; dependiendo de lo anterior se puede dar respuesta a dos cuestiones básicas: efectos letales (generalmente en pruebas a corto plazo) y efectos crónicos, los cuáles generalmente comprenden gran parte o todo el ciclo de vida del organismo. El problema con muchos organismo utilizados para experimentos toxicológicos es que presentan ciclos de vida muy largos.

Las características a evaluar van desde moléculas (proteínas, ADN), cambios en la fisiología, histología, comportamiento, hasta el análisis de los caracteres de ornato. Un ejemplo de lo anterior, es la prueba de imposex (en inglés), la cual consiste en estudiar la superposición de órganos o estructuras sexuales en ambos sexos; los gasterópodos como *Ilyanassa obsoleta* han sido utilizados para estudiar el efecto de las pinturas anticorrosivas, especialmente el TBT (tributyltin), que es uno de sus componentes (Curtis *et al.* 1998).

Los estudios de bioacumulación analizan los niveles de concentración de sustancias xenobióticas en los organismos. Son especialmente útiles los organismos filtradores, como el ostión que han sido utilizados para estudiar a los pesticidas solubles en agua, como el DDT, ya que son capaces de concentrar en sus tejidos hasta 70,000 veces más la

cantidad de pesticidas presentes en el agua. La pulga de agua es aun más eficiente ya que llega a concentrar hasta 100,000 veces más pesticidas que ocurren en muy bajas concentraciones (0.5 ppb) (Pimentel 1971).

Caracterización de un organismo biomonitor

Lower y Kendall (1990) establecen que todo organismo candidato al biomonitorio deberá tener las siguientes características:

1. Amplia distribución geográfica. Las especies cosmopóliticas permiten la rápida comparación entre sitios distantes.
2. Importancia ecológica. La especie deberá ocupar un sitio prominente dentro de la estructura de su comunidad; cualquier alteración en el ecosistema podrá ser reflejada por el.
3. Poco movilidad. Se prefiere a organismos sésiles, o con movimientos restringidos; se excluye de preferencia cualquier organismo migratorio.
4. Amplio conocimiento del espectro de respuesta que puede presentar el organismo ante estímulos ambientales, de tal manera que cualquier alteración de éstos parámetros pueden ser medidos y analizados.
5. Desde el punto de vista taxonómico deberá ser fácil de indentificar.

La utilización de organismos superiores ofrece más ventajas que el análisis de los organismos inferiores, ya que permite la detección de posibles efectos a nivel molecular, celular, órgano, sobrevivencia, etc.; los resultados deben permitir una inferencia en los

cambios en la historia de vida del organismo, lo que a su vez permite en cierta medida la predicción de las probables consecuencias a nivel del ecosistema en donde éstos organismos normalmente habitan (Klekowski *et al* 1994).

Algunos análisis comprenden la utilización de técnicas refinadas como la autorradiografía, la electroforesis y la inmunoquímica (Bradley 1990). A nivel molecular, una de las pruebas más utilizada es la prueba de Ames, la cuál utiliza cepas mutantes de *Salmonella*. Es una prueba rápida y confiable ya que es capaz de detectar muchos mutágenos, sin embargo, requiere de muchos controles y de una buena interpretación, incluso arroja resultados positivos con muchas sustancias consideradas inócuas (Ames *et al* 1973). Un enfoque opuesto es el propuesto por Hill (1995), quien argumenta que los caracteres de ornato que presentan algunos organismos, como las aves y peces, pueden ser utilizados como bioindicadores, ya que dichas características tienden a ser simétricas en los individuos sanos, por lo que cualquier asimetría detectada puede ser correlacionadas con el estrés ambiental.

En general, las investigación no solo pretenden identificar a las sustancias que afectan el material genético, sino que tratan de cualificar y cuantificar los efectos. Las direcciones que se han dado a éstos estudios abarcan desde la caracterización de los posibles efectos (teratogénesis, carcinogénesis, etc.), hasta la cuantificación para la elaboración de predicciones aplicando el análisis estadístico para estimar los riesgos (Malling 1972).

Los peces como biomonitores

Los peces son organismos ampliamente utilizados como biomonitores. Con la información generada ha sido posible, en ocasiones, extrapolar el daño observado en ellos con alteraciones de la salud humana (Powers 1989). Sin embargo, para extrapolar adecuadamente, se debe de contar con puntos de referencia y criterios de normalidad. Por ejemplo, en el caso de los peces, una incidencia de aberraciones cromosómicas y de malformaciones embrionarias menor al 10% es considerada normal (Klumpp *et al.* 1995). Entre las especies de peces más utilizadas en pruebas toxicológicas se encuentra *Fundulus grandis* (Courtney *et al.* 1984), y el guppy *Poecilia reticulata*, quien además presenta la ventaja de tener alta fecundidad, crecimiento rápido, tamaño pequeño y bajo costo de mantenimiento (Zimmerer 1984). La trucha es otro organismo que es muy utilizado en pruebas toxicológicas. En Baja California existe la especie *Oncorhynchus mykiss* (Rankin *et al.* 1994), desgraciadamente solamente se distribuye en la región montañosa, lo que dificulta su captura y transporte hasta los laboratorios en donde se practican esta clase de estudios.

Desde el punto de vista operacional, una de la principales ventajas en la utilización de los peces en estudios de biomonitorio, es que su respuesta es semejante a la de del resto de los vertebrados, en especial a la de los mamíferos. Este es el caso de los hepatocitos, el citocromo P-450 hepático, la producción de peroxisomas y el daño oxidativo del hígado cuando se enfrentan a sustancias genotóxicas (Al-Sabti y Metcalfe 1995). Sin embargo, debe mencionarse que la experimentación con otros organismos es importante pues permite preveer los posibles efectos de los contaminantes a nivel de

ecosistema; es decir, que sus resultados pueden ser aplicados, por ejemplo, permitiendo la formulación de hipótesis acerca del comportamiento del contaminante a nivel de ecosistema; esta es la esencia del biomonitoreo (Markert 1997).

Por otra parte, en el aspecto funcional, los estudios de genotoxicidad con peces son destacados por la importancia que tienen dentro de la estructura trófica de los ecosistemas acuáticos, además a la mayoría de los peces se les puede extraer sangre sin afectar su viabilidad, y practicar cultivos *in vitro* (Wolfe *et al.* 1969), esto los hace ideales para estudiar los efectos antes y después del estímulo (Blaxhall 1983 (B)). Otra ventaja es que los medios de cultivo suelen ser los mismo que los empleados con peces homeotermos, aunque con algunas especies marinas es necesario elevar el contenido de NaCl. La temperatura tampoco representa un problema debido a que las células presentan un buen crecimiento a temperatura ambiente, aunque en ocasiones se obtienen mejores resultados cuando son expuestos los cultivos a los mismos rangos de temperatura a los encontrados por los peces en condiciones naturales. En resumen, iniciar y mantener un cultivo de células de peces, es más sencillo que hacerlo con mamíferos, por lo que estas células son útiles para conocer fenómenos biológicos e incluso utilizarlo como material educativo (Nicholson 1972). En estudios *in vivo* los estudios de bioacumulación son importantes, por ejemplo en la detección de PCBs que se acumulan en el tejido epitelial, por ser el primer sitio de contacto con esta sustancia, o en las gónadas, que es el sitio por donde se acumula una parte importante del PCB, que solo es liberado al producirse la eyaculación; ambos tejidos pueden ser utilizados para identificar fenómenos de toxicidad específica y de destoxificación (Denizeau *et al.* 1984).

Según Al-Sabti y Metcalfe (1995), las principales líneas de investigación con peces son:

- Rompimiento de ADN por compuestos aromáticos en tejido hepático.
- Análisis de rompimiento de una sola hebra de ADN (alkaline unwinding ADN assay).
- Análisis de la producción de ADN.
- Electroforesis de una sola célula en microgel, técnica diseñada originalmente para determinar la respuesta de células de mamíferos, también ha demostrado presentar buenos resultados en los peces.
- Sin embargo, algunas técnicas practicadas con éxito *in vivo* en los mamíferos como las técnicas de metafase (intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas) han sido difíciles de implementar en los peces, debido al alto número cromosómico que presentan la mayoría de las especies disponibles, y lo pequeño de éstos cromosomas; aquellas especies que tienen cariotipos convenientes, como *Umbra Sp*, son difíciles de adquirir.

TABLA I. Otras líneas de investigación con peces

Comportamiento	Fisiología
• Quimiotaxis (evitar).	• Frecuencia de ventilación.
• Reotaxis positiva (facultad de nadar contra la corriente).	• Volumen de ventilación o amplitud.
• Movilidad.	• Toser (frecuencia).
• Posición y nado (locomoción).	• Impulsos eléctricos.
• Detección de muerte.	

Modificado de Balwin y Kramer (1994)

En suma, los estudios con peces se han centrado en la detección y cuantificación de los efectos, a nivel genético (mutaciones puntuales y cromosómicas), teratogenesis y carcinogenesis; también se incluyen modelos matemáticos (Malling 1972).

Cabe mencionar que la utilización de otros organismos, además de los peces, es muy importante ya que permiten hacer una mejor estimación de los efectos en los distintos niveles de los ecosistemas. También, a mayor conocimiento del ecosistema, mejor será el poder de predicción; en esto radica la importancia de la experimentación toxicológica *in vitro* e *in vivo*.

LOS PESTICIDAS

La palabra pesticida es un nombre genérico aplicado a un grupo de compuestos químicos sintetizados por el hombre, destinados al combate de ciertos organismos que ponen en peligro la producción de alimentos, dañan a la salud de forma directa, o son vectores de otros organismos transmisores de enfermedades. Existen grandes clasifica-

ciones, y estas se originan dependiendo de la clase de organismos a los que afecta de modo directo (Eblen y Eblen 1994).

La utilización de pesticidas "naturales" no es nueva, algunos de los más antiguos registros datan de 1,000 a.C., época en que se utilizaba el arsénico para controlar a los insectos. Sin embargo, no fue sino hasta 1898 cuando son sintetizados en laboratorio los primeros pesticidas, no siendo implementado su uso masivo sino hasta la década de los treinta y durante la Segunda Guerra Mundial (Younos y Weigmann 1988).

Actualmente se tienen un registro de unos 25,000 pesticidas, los cuáles incorporan más de 600 productos activos. El 65% son herbicidas, de 20-25% son insecticidas, y el restante fungicidas (Eblen y Eblen 1994). En México el auge en la utilización de los pesticidas inició en 1958, fecha en que el gobierno otorgó las primeras concesiones para su fabricación (Restrepo 1992).

Ventajas del uso de pesticidas

El balance hecho a los pesticidas, señala que no todo en ellos es negativo. En los Estados Unidos su empleo ha reducido el esfuerzo laboral en un 75% e incrementado la producción agrícola en un 280% (Eblen y Eblen 1994). A su vez, la Organización Mundial de la Salud, ha estimado que gracias al uso del DDT, cerca de 1,000 millones de personas han salvado su vida al no ser afectados por la malaria (Murty 1986). A nivel mundial el 80% de los plaguicidas se aplica a ciertos cultivos de importancia alimentaria [maiz (44%), soya (25%) y algodón (9%)]. Sin embargo, aún con la ayuda de los

pesticidas, la pérdida de cosechas continúa alcanzando a nivel mundial un promedio del 30% (Eblen y Eblen 1994).

Efectos indeseables de los pesticidas

Uno de los metabolitos del DDT, el DDE, ha sido señalado como causa del adelgazamiento de la cáscara de los huevos de gaviota, aguila y halcón por arriba del 20%, dobla el tiempo de ovulación en pinzones y provocar malformaciones en las crías de algunos patos (Pimentel 1971). Otro problema con los pesticidas es que destruyen algunos de los enemigos naturales de la plagas, como es el caso de la catarinita (ladybird). Además, los efectos en las especies naturales pueden ser indirectas, debido a que el habitat se modifica, por ejemplo algunos pesticidas cambian la calidad del alimento utilizado por organismos que no son el objetivo del control (Pimentel 1971). El destino de los pesticidas en el medio acuático es variado: puede ser volatizado, disolverse, permanecer suspendidos en forma cristalina, ser absorbidos a ciertas materiales, ser depositadas en el sedimento, o acumularse en los seres vivos (Younos y Weigmann 1988).

Ventas

En nuestro país las ventas de los pesticidas están distribuidas de la siguientes forma: insecticidas (51%); herbicidas (31%); fungicidas (15%), y el restante 3% otros agroquímicos. Hasta 1992 las ventas habían aumentado en un 15% anual, alcanzando en el mercado un valor de 80 millones de dólares anuales (Restrepo 1992).

Situación en Baja California

En Baja California, especialmente en sus regiones agrícolas, se aplican grandes cantidades de pesticidas; esto requiere de una amplia investigación para identificar los efectos en los ecosistemas de la región, así como la determinación de los posibles efectos en la salud humana (Dukelberg *et al.* 1994). En la región occidental de Baja California se han realizado diversos estudios sobre contaminación, sobre todo en sedimentos marinos, pero han sido pocos los estudios efectuados con organismos; en esta área destacan los trabajos efectuados con el mejillón *Mytilus californiensis* utilizados para estimar y contrastar los efectos tóxicos y genotóxicos de las aguas costeras contaminadas y de sitios de referencia (Chávez 1992, Márquez 1993).

CLASES DE EXPOSICIÓN

- **Exposición aguda (EA).** El organismo de prueba es puesto en contacto con la sustancia una sola vez. Frecuentemente los resultados son inmediatos, pero en otras ocasiones se presentan efectos parecidos a las exposiciones crónicas. Respecto a la expectativa de vida del organismo, estas pruebas son rápidas (Rand y Petrochelli 1985)
- **Exposiciones crónicas (EC).** Los organismos son expuestos a bajas concentraciones de una sustancia liberada de manera continua o con cierta frecuencia durante largos periodos (semanas, meses, años). Esta clase de exposición puede inducir efectos rápidos, similares a los observados en la EA., además de otros efectos de lento desarrollo.
- **Exposición subcrónica.** Se experimenta durante los periodos críticos de desarrollo (huevo, embrión, larva) del organismo.

TABLA II. Tiempo y frecuencia de las exposiciones

Tipo de exposición	Período de exposición	Frecuencia de exposición
Aguda	≤ 24 horas	Simple o repetida
Subaguda	≤ 1 mes	Repetida
Subcrónica	1-3 meses	Repetida
Crónica	> 3 meses	Repetida

(modificado de Dougherty, 1998)

TABLA III. Procesos que enfrentan los pesticidas en el medio ambiente

Procesos físicos	Procesos químicos	Procesos biológicos
Dilución	Ionización acuática	Trasformaciones biológicas
Mezclas	Hidrólisis	Bioacumulación
	Oxidación química	
	Fotólisis	

Modificado de Younos y Weigmann (1988).

LOS FUNGICIDAS

La introducción en 1870 de la enfermedad de la uva procedente de Estados Unidos *downy mildew* (en inglés) en Francia, inició una amplia investigación en busca de un fungicida eficiente. En 1882 Millardet descubrió que las hojas tratadas con una mezcla de sulfato de cobre resistían a la enfermedad (Agrios 1997).

Por otra parte, los compuestos a base de mercurio fueron introducidos en 1913, pero fueron retirados en la década de los sesentas por los efectos adversos que provocaban en los ecosistemas. En 1934 se introdujeron nuevos fungicidas, como Tiram, formulados a partir de los ditiocarbamatos, le siguieron Ferbam, Zineb, y Meneb. En 1965 se introdujo Carboxin, el primer fungicida sistémico, cuya principal característica es la intervención directa en procesos metabólicos (Deacon 1984), le siguió el benzimidazol Benomyl (Agrios, 1997). A pesar de la alta eficiencia reportada en primera instancia para los fungicidas sistémicos, actualmente se han detectado líneas resistentes a ellos; la resistencia ha sido atribuida a un gen estructural que codifica para la α -tubulina (Deacon 1984).

Benlate®

El fungicida Benlate®, también conocido como Tersan 1991, Benomyl®, y otros nombres es, según sus fabricantes, un fungicida seguro de amplio espectro (Agrios, 1997). Benlate® interfiere con los procesos nucleares. Una vez aplicado, la planta lo transforma a metil benzimidazol-2-yl-carbamato (carbendazin) y este compuesto inhibe

la polimerización de los microtúbulos del uso acromático de los hongos, de ahí el nombre de sistémicos (Deacon 1984). Uno de los primeros estudios con Benlate® fue el efectuado en ratas por Sherman *et al.* (1975), no encontraron ningún daño asociado con la reproducción, teratogénesis, y mutagénesis en ratas. Sin embargo, en otro estudio efectuado poco antes por Styles *et al.* (1974) reportaron alteraciones celulares (ver TABLA IV).

Uno de los principales motivos de preocupación por el fungicida Benlate®, que es un benzimidazol, es que tiende a sustituir a las purinas, que son importantes componentes del ADN (Rankin *et al.* 1977) y que interrumpe la polimerización de los microtúbulos. Es importante señalar que la toxicidad que un compuesto químico infringe sobre una especie, no necesariamente lo hace sobre otra; este es el caso de los peces, en quienes Benlate® induce una respuesta tóxica diferente (ver TABLA V).

Tabla IV

Descripción Técnica del Fungicida Benlate®

Nombres comerciales:	Benomyl, Benlate® 50, Tersan® 1991, Fungicida 1991, Fundazol.
Nombre químico:	Ácido carbónico, [1-(butilamino)carbonil]-1H-Benzimidazol-2-1)-metil ester; <u>Sinónimo</u> : Metil-1-(butil carbamil)-2-benzimidazolcarbamato.
Fórmula condensada	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃
Metabolito primario en mamíferos y productos de degradación en el ambiente	Carbendazin
Uso:	Fungicida agrícola
Categoría toxicológica:	IV
Tipo:	Sistémico del grupo de los benzimidazoles
Incompatibilidad:	No debe mezclarse con aceites
Persistencia:	Poco persistente
Efectos adversos en el ambiente:	Tóxico para los peces
Efectos adversos en la salud:	Ligeramente peligroso, penetra al organismo por ingestión, inhalación y a través de la piel
Precauciones:	Las generales para la mayoría de los plaguicidas.
Tratamiento en caso de intoxicación:	Sintomático.
Presentación:	Gránulos dispersables.
Forma de aplicación:	Se aplica sobre el follaje.
Análisis	Extracción con solvente orgánico, purificación de la extracción con un procedimiento líquido-líquido, y conversión del residuo a carbendazin. Niveles residuales son analizados con HPLC o con inmunoensayo.
Distribución de la mezcla	Material técnico, 99%; polvo humectante, 50%; metil-2-2 benzimidazol = carbamato, 99% (MCB metolite)
Ventas mundiales	US \$290 Millones. Corresponde al 50% de las ventas de los

	benzimidazoles.
Uso en el mundo	Registrado su uso en más de 50 países para más de 70 cultivos.
Reacciones adversas	Cardiacas: edema Dermatológica: dermatitis, eczema, fotosensibilización, hiperpigmentación, eritema dermal. Ocular: conjuntivitis. Respiratoria: tos.
Contaminación (tratamiento):	Oral: lavado; ocular: irrigar con solución salina abundante dermal: lavar con agua y jabón; remover toda la ropa. Terapia de soporte: esteroides para tratar la dermatitis cutánea.
Implicaciones en el embarazo	Teratogénico en roedores (dosis > 100 mg/Kg/día).
Uso en México	Autorizado (Restrepo 1992)

TABLA V. Sumario de Toxicidad Aguda de Benlate®

Organismo de prueba	Peso (gr)	Temp (°C)	DL50 IC 95% (µg/L)	Organismo de prueba	Peso (gr)	Temp (°C)	DL50 IC 95% (µg/L)
Trucha arcoiris	1.2	12	170 (120-230)	<i>D. pulex</i>	1 ₁	16	- 680
Fathhead Minnow	0.9	22	2,220 (1,590-3,049)	<i>G. lacustris</i>	M	21	78 (54-113)
Bagre	1.2	22	29 (22-37)	<i>Pteronarys</i>	YC ₂	15	<18
Bluegill	0.9	22	850 (550-1,300)	Curthroat trout	1.0	13	9 (8-10)
Trucha arcoiris	1.0	12	310 (250-390)	Trucha arcoiris	1.0	13	18 (15-20)
Fathhead minnow	0.5	22	1,900 (1,430-2,530)	Goldfish	1.0	18	348 (261-466)
Bagre	1.2	22	28 (21-34)	Fathhead minnow	1.0	18	125 (96-164)
Bluegill	0.6	22	1,200 (990-1,590)	Bagre	1.1	18	105 (85-129)
Trucha arcoiris	0.2	12	370 (268-510)	Bluegill	1.5	18	67 (51-96)
Bagre	0.8	22	16 (11-23)	Largemouth bass	0.8	18	41 (36-47)

Tomado de United States Department of the Interior Fish and Wildlife Service Serial Resource Publication 137. Washinton, D. C. 1980.

LOS CITOTÓXICOS

La primera evidencia de producción de cáncer por agentes ambientales data de 1775, cuando Percivall Pott encontró que el oficio de desollador se correlacionaba con el cáncer de escroto (Friedberg *et al.* 1994). En los años cuarentas se encontró que si dos sustancias se aplicaban por separado sobre la piel de un conejo, no sucedía nada, en cambio la aplicación conjunta de ellas era capaz de producir tumores cancerosos. Hoy se sabe que esto es el resultado de un efecto sinérgico entre ambas sustancias, una actúa como iniciador y la segunda como promotor de tumores; hoy se sabe que son sustancias carcinogénicas, y actúan produciendo efectos específicos sobre el ADN. También son conocidos los promutágenos, que son sustancias que únicamente dentro de un sistema biológico son capaces de inducir la formación de tumores; el pesticida Aloclor induce mutaciones en procariotes y eucariotes sólo después de que ha sido activado por el metabolismo de ciertas plantas (Dunkelberg 1994). Las aberraciones cromosómicas abundan en las células tumorales. La célula humana posee normalmente 23 cromosomas, sin embargo, las células tumorales están caracterizadas por presentar aneuploidias y translocaciones. Como regla cada tumor presenta su propio conjunto de anomalías, sin embargo algunas anomalías recurren en todos los tumores, como el llamado cromosoma Filadelfia, que se produce por una fusión de los cromosomas 9 y 22, que es característico de cierta clase de leucemia y el linfoma de Burkitt (Lodish *et al.* 2000).

Las sustancias carcinógenas se han encontrado en el aire, el agua, lugares de trabajo, medicinas y en los alimentos (Prescott y Flexer, 1982); muchas de ellas son generadas como subproductos de una combustión incompleta de compuestos orgánicos

(carbón, petróleo, tabaco) (Morrison 1987). Por ejemplo el benzo[a]pireno es un subproducto de la combustión que se acumula en las parrillas para asar y en el hollín de las chimeneas. En el hígado el benzo[a]pireno se convierte en epoxi diol que induce mutaciones, las que a su vez promueven un crecimiento descontrolado de ciertas clases de células hepáticas (Carey 1999). Químicamente, los carcinógenos son sustancias electrofílicas que sufren ataques nucleofílicos por los nucleótidos presentes en las bases del ADN (Morrison 1987). Sin embargo, actualmente no se tienen evidencias completas de que la frecuencia de las enfermedades genéticas se haya elevada como resultado de la exposición a fármacos o sustancias ambientales (Cortinas de Nava *et al.* 1984).

Actualmente la investigación se centra en los oncogenes, pero no se descarta que ciertas sustancias químicas presentes en el medio ambiente contribuyan también a la carcinogénesis, llegando a actuar de forma sinérgica con los oncogenes.

Formación de los micronúcleos

1. Durante la anafase, una cromátida céntrica y un fragmento cromosómico se retraen del resto de los cromosomas, los cuales se mueven hacia los polos del uso. El micronúcleo (MN) se origina cuando el fragmento queda fuera del núcleo (Al-Sabti 1991).
2. El elemento retrazado podría quedar dentro de la célula hija, pero el MN tendrá un tamaño, en mamíferos, que alcanza de 1/5 a 1/20 del diámetro del núcleo principal. En peces el MN puede ser mucho menor debido a que los cromosomas de los peces son más pequeños, por lo que un micronúcleo puede tener un tamaño de 1/10

a $1/30$ del tamaño del núcleo principal. La presencia del MN depende de la cinética de división celular del tejido estudiado; este a su vez depende de la clase de tejido, la condición del pez, y el ambiente (temperatura). Por lo anterior no es posible establecer un tiempo de cosecha preciso. Sin embargo, si se agrega citocalasina-B a los cultivos, las células son bloqueadas en su citocinesis, sin impedir la división de los núcleos, de esta manera se observa una célula binucleada y, si lo presenta, un MN.

3. No todos los MN se originan por agentes clastogénicos, por ejemplo pueden originarse por una no disyunción provocada por una exposición a un tóxico del uso. Sin embargo, el mecanismo por medio del cual se generan los MN en los peces no está totalmente claro, así como tampoco la interacción entre el tóxico y las poblaciones de células. Es probable que muchas de las sustancias que producen los MN no son clastógenas, y que el micronúcleo sea el producto de una inactivación de las fibras del uso. En los peces, las células más estudiadas son los eritrocitos, ya que son células abundantes, fáciles de distinguir y poseen núcleo; se prefiere contar los eritrocitos periféricos.

Principios de la técnica

1. Mientras que durante la anafase los elementos céntricos quedan dentro del núcleo, los acéntricos tienden a quedar fuera del núcleo, dando origen a núcleos anormales. Durante la telofase; el fragmento acéntrico quedará incluido en la célula hija en forma de MN. Si las fibras del uso se ven afectadas también será generado un MN, aunque tienden a ser más grandes que los fragmentos acéntricos.
2. Los MN pueden ser localizados en las siguientes células de la médula ósea: mielocitos, mieloblastos y eritroblastos, en las células con poco citoplasma es fácil confundir a los MN con los bordes rugosos del núcleo, por lo que no son recomendables para esta clase de estudios.
3. En los eritrocitos de los mamíferos los micronúcleos son fáciles de localizar, ya que por alguna razón desconocida mientras que el núcleo principal es expulsado los MN perduran.
4. En los mamíferos, los eritrocitos jóvenes (≤ 24 horas), se tiñen de color rojo, mientras que los eritrocitos maduros se tiñen de azul. Exceptuando a los eritrocitos, la morfología de otras células no revelan si ha ocurrido mitosis durante el periodo de prueba.
5. Típicamente las células con MN presentan solo uno, aunque no es raro encontrar dos o más. La forma de los MN es redonda, o de almendra; si los cuerpos encontrados difieren de la anterior descripción deberán ser clasificados esos encuentros de otra manera.

6. Durante un experimento, la tasa mayor de producción de MN ocurre entre el primer y quinto día. Sin embargo, lo anterior dependerá de la especie (homeotermos, poiquilotermos) y de algunas variables ambientales (temperatura). En estudios con peces por ejemplo, éstos deberán ser sacrificados a diferentes intervalos de tiempo, hasta no lograr un procedimiento estándar con ellos. En pruebas *in vitro*, se debe esperar unos 5-6 días para cultivar los eritrocitos, en contraste con los mamíferos que tardan 72 horas (Schmid 1975).
7. Para observar los MN se puede utilizar naranja de acridina, citocalasina-B, reactivo de Shiff, Giemsa.
8. Para evaluar el poder clastogénico de una sustancia, se deben contar por lo menos 1,000 células de cada individuo (Lovell *et al.* 1989); Al-Sabti y Metcalfe (1995) sugieren contar hasta 4,000 células para detectar el efecto de los clastógenos débiles. Para células bloqueadas con citocalasina-B es suficiente contar 500 células. También existen técnicas automatizadas como la citometría de flujo, la cual permite contar hasta 50,000 células rápidamente. A pesar de estos estándares bien establecidos, no es extraño encontrar en la literatura que distintos laboratorios hagan identificaciones y clasificaciones diferentes; de ahí la importancia de establecer procedimientos estándar (Schmid 1976).
9. La clase de célula por estudiar deberá presentar una tasa de división celular alta y ciclo de división bien conocido. En los seres humanos lo anterior no reviste problemas porque es bien conocido el ciclo celular, pero en otros, como los

teleosts, se sabe poco, básicamente por la naturaleza poiquiloterma de su metabolismo.

Ventajas de la técnica de micronúcleos

1. Es un método más sencillo, pero menos preciso, que el análisis cromosómico.
2. Al-Sabti y Metcalfe (1995) señalan que la técnica de MN, comparada con la cromosómica, presenta las siguientes ventajas:
 - a. La frecuencia de aberraciones en las cromátidas es baja, típicamente menor de 0.5%. Sin embargo, en cultivos de células es posible aumentar esta cantidad, debido a factores poco controlados durante el cultivo.
 - b. Los micronúcleos que se originan espontáneamente en los eritrocitos policromáticos es del orden de 3 o/oo y se mantiene constante.
 - c. La prueba responde bien a bajas concentraciones con sustancias que normalmente provocan rompimientos cromosómicos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y MATEMÁTICO

El análisis probit

De todos los métodos disponibles para calcular la ED50 (*effective dosis 50*), la técnica probit es la más utilizada en toxicología y farmacología (Abel y Axiak 1991). Otros métodos como el de Sperman-Kärber producen los mismos resultados, pero tienen el inconveniente que debe tenerse registro del 0 y del 100% de la mortalidad en los diferentes tratamientos para efectuar los cálculos; con la técnica probit basta una respuesta del 20-80% para efectuarlos (Wardlaw 1985). Sin embargo, el principal inconveniente con esta técnica es que los cálculos resultan largos y tediosos cuando son aplicados completamente, pero se dispone actualmente de programas de cómputo que los hacen de forma automatizada, permitiendo calcular la ED50 y los límites de confianza (Wardlaw 1985). El método original fue desarrollado por Gaddum (1933) y Bliss (1934-1935) (Finney 1952), pero resultaba muy elaborado para implementarlo con sencillez; una sustancial modificación fue hecha por Lithfield y Wilcoxon en 1949, al sustituir los cálculos matemáticos por una rápida solución gráfica, que tiene como único inconveniente la subjetividad de los resultados (Newman 1995).

La idea básica de la técnica probit se basa en las siguientes premisas (Goldstein 1962):

1. Para datos biológicos la transformación lagaritmica es mejor (Mead y Curnow 1983).
2. Ante los tóxicos los sistemas biológicos presentan una respuesta gradual.

3. Si es graficado el logaritmo de la dosis en el eje X y la respuesta en el eje Y , se obtiene una curva sigmoide, que para la mayor parte de la respuesta tiene forma lineal. Esto significa que en "grandes" rangos de la respuesta se tendrá una "incremento" lineal.
4. Con fines estadísticos la curva log dosis-respuesta tiene una distribución de frecuencia acumulativa normal.
5. Cuando la respuesta que se está midiendo es cuantitativa, en el sentido de qué responde o no, el punto medio de la curva será el equivalente a la CM50 (concentración mediana efectiva para el 50%, ED₅₀, en inglés).
6. Las dos características principales de toda curva dosis-respuesta son su posición con respecto al eje X , y su pendiente. Por lo tanto, si dos sustancias tienen el mismo efecto, pero solo difieren en potencia, las pendientes de sus curvas deberán ser iguales. Por el contrario, pendientes distintas implicarán mecanismos de acción diferentes.
7. El eje Y se mide en desviaciones normales equivalentes (DNE), cuyo valor cero corresponde al 50% de los individuos, una unidad por encima (+) o por debajo (-) corresponde a una desviación estándar (aproximadamente un 34%). Así, una DNE de 1 corresponderá al (50% + 34%) = 84% de los individuos, en tanto que una DNE de -1 corresponderá al (50% - 34%) = 16%.
8. La modificación hecha por Bliss a los DNE resultó en la escala probit. Ésta consistió en agregar +5 a la DNE para eliminar los números negativos (Bliss 1957), así mientras la DNE iba desde -3 a +3, con el +5 agregado la escala

probit presenta un rango de 2 a 8. El punto 5 en la escala probit corresponde a la respuesta del 50%, un probit de 6 corresponde a la respuesta del 84%, mientras que un probit de 4 corresponde a la respuesta del 16% de los individuos, un probit 3 al 3% (aproximadamente), etc.

9. La principal ventaja del método es que provee la CL50 y los límites de confianza rápidamente.

Es importante señalar que la técnica probit no establece niveles de seguridad, simplemente es útil para, por ejemplo, comparar la respuesta tóxica de sustancias distintas, o en una sustancia aplicada en concentraciones diferentes sobre una especie, o entre especies distintas.

Interpolación

La determinación gráfica de la CL50 se efectúa por la técnica de interpolación manual. El punto 5 de la ordenada (eje *Y*) en escala probit corresponde a un 50% de mortalidad, a partir de este punto se tiende una recta perpendicular a la ordenada hasta intersectar la curva. En el punto de intersección de la curva se tiende otra recta paralela a la ordenada, hasta intersectar la abscisa (eje *X*). El punto de intersección con la abscisa corresponde a la dosis (transformada a log), capaz de provocar la muerte del 50% de los organismos (CL50) (Newman 1995, 1998).

Cálculo de los intervalos de confianza con la Ecuación de Litchfield y Wilcoxon

La principal ventaja del método de Litchfield y Wilcoxon (L-W) es que permite calcular los intervalos de confianza al 95% de la CL50 (Goldstein 1962) de forma rápida y sin tantos cálculos matemáticos. Usualmente se utiliza papel semilogaritmico y se grafican los datos preeliminares de toxicidad, pero sin contar las mortalidades 0 y 100% (Newman 1995), enseguida se tiende una línea preliminar a través de los puntos, en especial entre los puntos 40 y 60%. Utilizando la línea se extrae la concentración correspondiente a 16%, 50% y 84%; éstos porcentajes equivalen a 4, 5 y 6 unidades probit respectivamente, éstos valores corresponden a la CL16, CL50 y CL84 (Newman 1998).

$$S = \frac{\frac{CL84}{CL50} + \frac{CL50}{CL16}}{2}$$

Para calcular el intervalo de confianza menor se resta S de la CL50; para calcular el intervalo de confianza superior se suma S a la CL50, quedando así establecidos los intervalos de confianza al 95% (Newman 1995).

MATERIAL Y METODOS

La elección de las especies para el presente trabajo se hizo con base en dos criterios: 1) no poner en riesgo ninguna especie nativa (ambas especies son introducidas), y 2) que ambas cumplieran con los criterios internacionales establecidos para las especies de peces biomonitoras. El pez espada *Xiphophorus helleri* es exótico, y se presenta únicamente en los Arroyos San Ignacio y San Pedro; el pez mosquito *Gambusia affinis*, se localiza en B.C. únicamente en el Noroeste y la región del Cabo (Ruiz-Campos *et al* (en prensa))

TABLA VI. Comparación de un pez biomonitor ideal contra las especies utilizadas en este trabajo:

Pez biomonitor ideal	<i>G. affinis</i>	<i>X. helleri</i>
1. Amplia distribución geográfica	Si	No
2. Especie abundante	Si	No
3. Ecológicamente importante	Si	Si
4. Fácil de transportar	Si	Si
5. Cultivo sencillo	Si	Si
6. Adaptable a condiciones de laboratorio	Si	Si
7. Ciclo de vida corto	Si	Si
8. Madurez sexual temprana	Si	Si
9. Abundante progenie	Si	Si

Modificado de Courtney 1984.

COLECTA DE LOS PECES

Pez espada *Xiphophorus helleri*

Los peces espada *Xiphophorus helleri* fueron colectados en el Arroyo San Ignacio, B.C.S. Para capturarlos se utilizaron cinco trampas sardineras (tipo *Minowtramp*, en inglés) a las que se les añadió un cebo consistente en pequeños trozos de tortilla de harina (Alaniz 1995). Las trampas fueron colocadas en la parte más baja del arroyo, así como en el canal que lo rodea, ambas con profundidades entre los 30-90 cm; las trampas permanecieron en el agua de 2-12 horas. Se colectaron aproximadamente 400 peces. Los peces capturados fueron depositados en un recipiente para agua marca *IGLOO* de 10 galones de capacidad. Desde el momento en que los peces fueron retirados del cuerpo de agua hasta su llegada al laboratorio se les suministró aereación constante. Para oxigenar el agua se utilizaron dos bombas portátiles marca *PENN-PLAX Silent Air B10*, que funcionan con dos baterías de 1.5 voltios.

Pez mosquito *Gambusia affinis*

Los peces mosquito *Gambusia affinis* fueron colectados en el arroyo La Misión, o arroyo de Guadalupe, localizado a 35 Km al norte de Ensenada y a 65 Km al sur de Tijuana en el estado de Baja California (Cabrera 1997). La captura se realizó en la región norte del arroyo, caracterizada por la presencia de sitios poco profundos, con poca circulación de agua y charcas con una gran cantidad de materia orgánica en descomposición. En éstos sitios la abundancia de los peces mosquito fue >99%. También se efectu-

aron muestreos prospectivos en zonas abiertas, profundas y con poca vegetación, pero no se encontraron peces mosquito. La colecta se realizó durante la primavera y el otoño.

Para capturar a los peces se utilizó un chinchorro sardinero (3.5 mm de luz), el cual fue arrastrado por distancias de 5-20 m por diferentes charcas y canales con profundidad de 30 a 100 cm. Los peces capturados presentaron mortalidad >20% debido a que durante el arrastre se levantó una gran cantidad de lodo, lo que propició eventos de anoxia. Inmediatamente después de la captura los peces fueron lavados y transferidos a un depósito con agua limpia y con bombas de aereación portátiles. Los peces sobrevivientes fueron transportados a las instalaciones del bioterio de la Facultad de Ciencias de la U.A.B.C., transcurriendo aproximadamente 1 hora entre el momento de la captura y la depositación de los peces en el estanque principal. Se capturaron aproximadamente 800 peces.

Mantenimiento en el laboratorio

Los peces capturados permanecieron en las instalaciones del bioterio y en el laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, U.A.B.C. hasta su utilización en los diferentes experimentos. Los peces fueron colocados en estanques de fibra de vidrio de 200 litros de capacidad, los cuáles fueron lavadas y desinfectadas previamente con cloro diluido en agua, después se les acondicionó el filtro biológico, el cual se dejó "madurar" durante 15 días previos a la introducción de los peces capturados. La aereación en el bioterio se efectuó con ayuda de dos bombas de aire estacionarias automáticas; en el laboratorio se utilizaron 6 bombas eléctricas portátiles Challenger I.

Durante las primeras 72 horas posteriores a la colocación de los peces en las peceras, no les fue suministrado ninguna clase de alimento. Esto se hizo con el fin de eliminar a los individuos más débiles, enfermos o heridos durante la captura y el transporte. La alimentación consistió en hojuelas TETRA® especialmente formuladas para peces tropicales; el alimento se les proporcionó dos veces al día, la cantidad empleada fue aquella que podían consumir dentro de los primeros ≤ 5 minutos después de que era añadido. Los peces que morían eran retirados en cuanto se les detectaba y ocasionalmente se sacrificaron a los peces que mostraban un marcado deterioro físico. En ninguna de las dos especies utilizadas se registraron mortalidades de $\geq 10\%$; cualquiera que haya sido la causa de estas muertes, no pareció afectar la viabilidad del resto, ya que vivieron en el estanque durante semanas sin ningún síntoma aparente de enfermedad.

Pruebas toxicológicas: Determinación de la CL50

Las pruebas de determinación de la concentración letal (CL50) se llevaron a cabo utilizando acuarios, bombas de aereación, peces y diversas concentraciones del fungicida Benlate®.

Procedimiento:

1. En cada tratamiento se utilizaron 10 peces, así como en su respectiva réplica. Cada uno de los experimentos tuvo un diseño diferente, por lo que la cantidad de peces empleada fue diferente en cada uno. Los peces fueron extraídos al azar del acuario principal, poniendo suavemente en movimiento el agua para

que los peces no se mantuvieran agregados. Los peces fueron capturados en distintas partes de acuario, así como en diferentes profundidades. Para la captura se utilizó una red de acuario convencional. La captura se hizo en periodos de dos minutos aproximadamente para no estresar a los peces, procediendo a reiniciar el proceso después de algunos minutos. No se hizo distinción de sexo o tamaño del pez para utilizarlos en los experimentos.

2. Cada pez extraído de la manera descrita, fue asignado al azar a cada uno de los diferentes tratamientos. Para la asignación se utilizó una calculadora científica de bolsillo CASIO *FX-115W*, la cual es capaz de producir números al azar entre 000 y 999; éstos números fueron divididos entre la cantidad de acuarios a utilizar; por ejemplo en un experimento se utilizaron 14 peceras, por lo que un número aproximado de 71 ($999/14 \approx 71$), de esta forma el primer acurio le fue asignado el intervalo de: 000-071, al segundo 072-143, etc. Una vez rotulados los acuarios con sus respectivos intervalos de numeración, cada pez extraído se asignó a los diferentes tratamientos según el número arrojado por la calculadora en ese momento; cuando alguno de los acuarios, por azar, completaba la cantidad de peces asignados, y en caso de que algún pez recién extraído cayera dentro del intervalo de este, simplemente se volvía a pedir un nuevo número al azar a la calculadora. La asignación de los peces de la forma anteriormente descrita, se hizo con el fin de evitar cualquier sesgo en la asignación de los peces a los diferentes tratamientos (Gelber *et al* 1985). A su vez, cuando todos los peces estuvieron distribuidos en las diferentes peceras.

estas fueron sorteadas para asignarlas al azar a un determinado tratamiento. En cada uno de los experimentos se repitió el mismo procedimiento, menos en los acuarios destinados a contener a los controles.

3. Los acuarios empleados para los experimentos contaron en todo momento con aereación continua, la manguera utilizada contó con piedra para disminuir el volumen de las burbujas y mejorar la aereación; no se suministró ninguna clase de alimento durante los experimentos.
4. Al inicio y al final de cada experimento se registraron algunos parámetros fisicoquímicos (oxígeno disuelto, porcentaje de saturación de oxígeno, dureza, conductividad eléctrica, pH, y temperatura). La medición de los parámetros se realizó dentro de la primera hora después de iniciado el experimento, para ellos se tomó una muestra de unos 2 L aproximadamente. La lectura de los parámetros se hizo de forma automática, para ello se utilizó el analizador portátil *Hidrolab Scout 2*. Previamente los sensores del analizador fueron lavados con agua destilada y desionizada. Para determinar los parámetros fisicoquímicos se cuidó en tomar las muestras en orden ascendente de concentración de pesticida (0 hasta el más alto). Una vez medidos los parámetros, la muestra fue devuelta al acuario del cual se tomó.
5. La observación y registro del comportamiento y sobrevivencia de los peces se hizo en los siguientes tiempos: 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 horas, y después diariamente (Sprage 1990; Abel y Axiac 1991).

6. Los individuos muertos eran retirados en cuanto se les detectaba. Para la extracción se utilizó una red diferente para cada tratamiento; también se registró el tiempo en que se detectaba a los peces muertos.
7. En algunos experimentos (ver el protocolo de cada uno) a los peces sobrevivientes se les colocó en baños de recuperación que contenía agua limpia y oxígeno; no se les suministró ninguna clase de alimento, solo se registró el comportamiento y la sobrevivencia que presentaron.
8. Una vez concluido el experimento, se procedió a lavar con abundante agua y jabón cada acuario, así como llenarlos de agua y dejarlos así durante dos días. Trascurridos dicho tiempo eran de nuevo vaciados y vueltos a lavar; este proceso se repitió tres veces en cada experimento para eliminar la mayor cantidad posible de trazas del pesticida.

Estudios genotóxicos y citotóxicos

Los peces que sobrevivieron al experimento 5 con el pez mosquito *Gambusia affinis* fueron sacrificados para obtener una muestra de sangre; con la sangre se prepararon laminillas para estudiar los eritrocitos, mientras que el experimento 7, que fue realizado con los peces espada, se diseñó para estudios genotóxicos.

Obtención de la sangre

Para obtener la sangre se practicó una insición con un bisturí en la región dorso-craneal (nuca) de los peces, tras lo cual fueron colocados boca abajo para que fluyera una mayor cantidad de sangre por la herida, procediendo después a colectarla en un portaobjeto nuevo, el cual previamente fue lavado con agua jabonosa, y enjuagado con alcohol diluido en agua destilada (50:50). Con la sangre así obtenida, se realizó un frotis por pez, que se dejó secar sobre una plancha metálica calentada a 45 °C para acelerar el proceso de secado. Después se procedió a teñir la laminilla con el colorante de Giemsa (1mL solución madre : 1mL de buffer de Sorensen : 18 mL de agua destilada), durante 10-12 minutos. Los mejores tiempo de tinción fueron establecidos previamente con otros peces en pruebas piloto. El análisis microscópico se hizo con el método ciego, para lo cual a cada laminilla preparada se le aplicó una clave que cubría las características del tratamiento al que estuvo sujeto el pez del cual procedía esa sangre. Ésta marca fue removida únicamente cuando finalizó el análisis microscópico y se procedió al análisis estadístico de los datos. Para el análisis microscópico se utilizó un microscopio óptico Bausch & Lomb. La evaluación de las laminillas se efectuó con un aumento de 1.000 X.

En cada una de las laminillas preparadas fueron analizados 1,000 eritrocitos de sangre periférica.

Análisis de los resultados

El análisis de los resultados se hizo utilizando el programa PRIMER (McGraw-Hill, 1987) para dos. La interpolación de las gráficas para el cálculo de la CL50 se hizo con el programa SIGMA PLOT v. 5, los cálculos se hicieron con Excel 97 y calculadora de bolsillo.

TABLA VII. Experimentos llevados a cabo (forma y propósito)

Exp.	Propósito	Tratamientos	Concentración de Benlate®
1	Contrastar el efecto producido por Benlate® en el pez mosquito, en las mismas concentraciones utilizadas en un trabajo previo (Silva 1997).	Cuatro tratamiento y un control con una réplica c/u.	1,6, 2,6, 10 y 500 mg/l.
2	Probar en los peces mosquito 5 concentraciones de Benlate®, que aumentan en progresión geométrica.	Cinco tratamiento y un control, cada uno con una réplica	32, 63, 125, 250 y 500 mg/l.
3	Probar en los peces mosquito 5 concentraciones de Benlate®, todas, menos una, no utilizadas en el experimento 2 (efectos subletales).	Seis tratamiento y un control, cada uno con una réplica	1, 2, 4, 8, 16 y 32 mg/l.
4	Experimento con tres de las utilizadas en el experimento 3 (repetición con dosis subletales).	Tres tratamientos y un control, cada uno con su réplica	2, 4 y 8 mg/l.
5	Repetición del experimento 4 con dos de las concentraciones.	Dos tratamiento y un control, cada uno con su réplica	4 y 8 mg/l.
6	Experimento con el pez espada con cuatro de las concentraciones utilizadas en el experimento 2 con el pez mosquito.	Cinco tratamientos y un control, cada uno con una réplica	16, 32, 63, 125 y 250 mg/l.
7	Experimento con espada con seis concentraciones distintas de Benlate® para análisis de genotoxicidad y citotoxicidad	Seis tratamiento y un control, cada uno con una réplica.	1, 2, 4, 8, 16 y 32 mg/l.

RESULTADOS

ASPECTOS ETOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS DE LOS PECES

Comportamiento

Aunque no se llevó a cabo ningún registro pormenorizado, se observó que los peces sometidos a los diferentes tratamientos con el fungicida Benlate® presentaron un marcado descenso en el movimiento natatorio con respecto a los controles; este comportamiento motriz se observó poco después de ser introducidos en los tratamientos. Los peces en los controles no disminuyeron su movilidad normal durante todo el experimento, excepto en aquellos peces que posteriormente murieron (Fig. 1).

Bránquias

Las bránquias de los peces tratados mostraron un rápido congestionamiento, con el consecuente enrojecimiento de los filamentos; incluso parte del opérculo presentó un enrojecimiento notable con respecto a los controles. El movimiento que presentaron los operculos fue notablemente mayor que el de los controles, sin embargo, éste movimiento decayó marcadamente en los días subsecuentes hasta llegar a constituir solamente un ligero movimiento en lapsos relativamente prolongados.

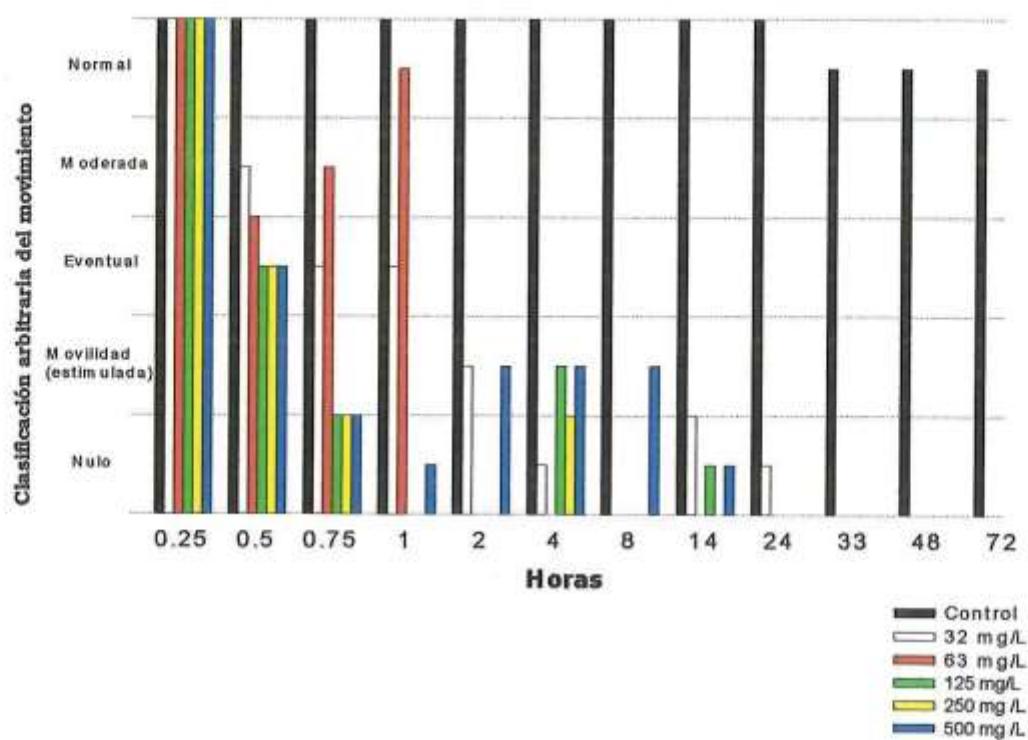


Figura No. 1. Gráfica del comportamiento de locomoción experimentado por los peces mosquito *Gambusia affinis* expuestos a 6 diferentes concentraciones del fungicida Benlate® durante el experimento 2.

Comportamiento de las hembras y los alevines

Invariablemente, todas las hembras sometidas a algún tratamiento, por mínimo que fuera, tendieron a presentar partos en un tiempo menor a los 30 minutos a partir del momento en que fueron introducidas en los acuarios; los alevines presentaron un nado acelerado en el momento de nacer, acudían a la superficie abriendo su boca, así permanecieron algunos minutos; después disminuyeron considerablemente su movimiento, hasta quedar postrados sobre en fondo del acuario. La mayoría murió en pocas horas, aunque se llegaron a registrar alevines sobrevivientes en los tratamientos menores, por lo menos 24 horas, sin embargo no se registró sobrevivencia posterior porque los juveniles se perdían en el recambio diario del agua. En una ocasión fueron colocados 5 alevines en un frasco con agua limpia, pero murieron dentro de las siguientes 72 horas.

Comportamiento de los machos

Todos los machos del pez espada *Xiphophorus helleri*, y un poco menos los del pez mosquito *Gambusia affinis*, son territorialistas, sin embargo, se observó que en los peces sometidos a los diferentes tratamientos este comportamiento desapareció, presentándose incluso el caso de agregación de varios individuos en ciertas regiones del acuario. El libido de los peces tratados se redujo a cero, no así en algunos de los machos de los controles, en los cuales se observaron avances normales con las hembras.

Condición de los peces

En los experimentos con duración de una semana, se observó un marcado descenso en la condición de los peces, presentándose un rápido adelgazamiento, sobre todo en los machos; este fenómeno se registró tanto para los peces experimentales, como en los controles de ambas especies estudiadas; la evaluación fue visual y se hizo al contrastar a los peces de los experimentos con los peces que permanecieron en el acuario reservorio para futuros experimentos.

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

Los parámetros fisicoquímicos evaluados en cada experimento fueron seis: temperatura, pH, salinidad, porcentaje de saturación de oxígeno, oxígeno disuelto (p.p.m.), y conductividad eléctrica. Como se estableció en la sección de material y métodos, éstos parámetros fueron cuantificados al inicio y al final del experimento (Fig. 2).

En general, los parámetros evaluados no mostraron en ninguno de los experimentos realizados se observaron variaciones marcadas entre el inicio y el final de los experimentos, con la excepción de el porcentaje de saturación del oxígeno y del oxígeno disuelto en los cuáles ocurrieron las mayores variaciones.

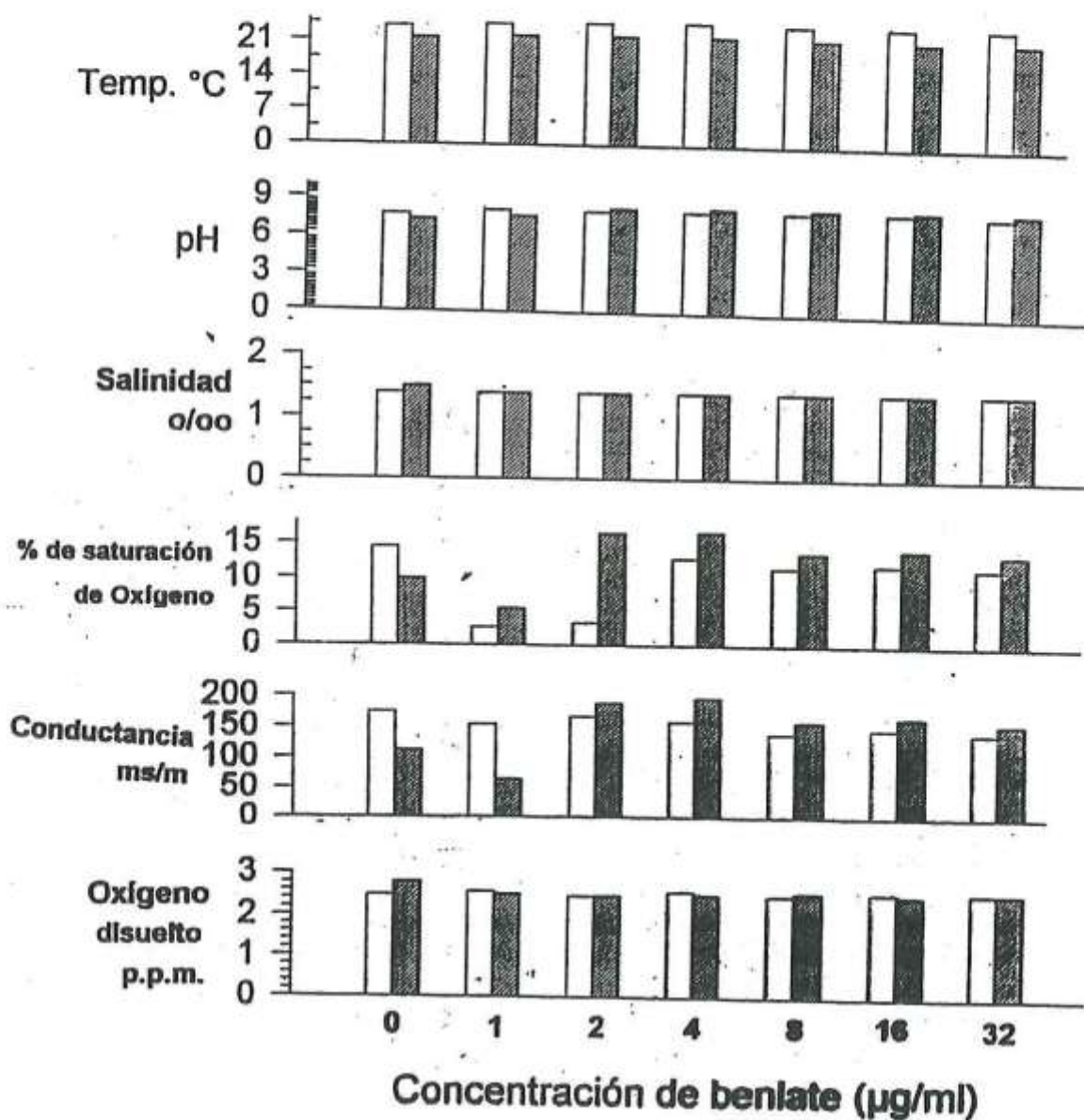


Figura 2. Parámetros fisicoquímicos al inicio y al final del primer experimento con el pez mosquito *Gambusia affinis*.

Experimento 1. Peces mosquito *Gambusia affinis* aclimatados durante cuatro generaciones en acuarios de la Facultad de Ciencias sometidos al fungicida Benlate®

En el primer experimento con el pez mosquito *Gambusia affinis* se registró una mortalidad muy similar en los tratamientos con la concentración más baja de Benlate®, incluyendo el control (Fig. 3).

En el experimento fue notable la muerte de un 30% de los controles, cifra que incluso rebasó al porcentaje alcanzado por los peces sometidos a la segunda dosis mayor (40 mg/L); también se registró un comportamiento paralelo en el índice de mortalidad alcanzados por ambos tratamientos, excepto durante el último día, cuando los controles rebasaron en un 10% la mortalidad de los peces sometidos a la concentración de 40 mg/L. Ambos tratamientos presentaron un comportamiento similar durante todo el experimento, excepto durante el último día, cuando los controles superaron la mortalidad presentado por los peces sometidos a 40 mg/L.

En los tratamientos de 1.6, 2.6 y 40 mg/L, no se presentaron eventos de mortalidad masiva en el transcurso de los días; llama la atención de qué la mortalidad menor (10%) ocurrió en el segundo tratamiento mayor (40 mg/L). En cambio, en los peces sometidos a la mayor concentración (500 mg/L) no se registró ningún sobreviviente más allá de 96 horas; fue notable el hecho de qué durante los primeros dos días, la mortalidad, con respecto al resto de los tratamientos, fue relativamente igual, sin embargo, al inicio del tercer día murió el 100% de los sobrevivientes.

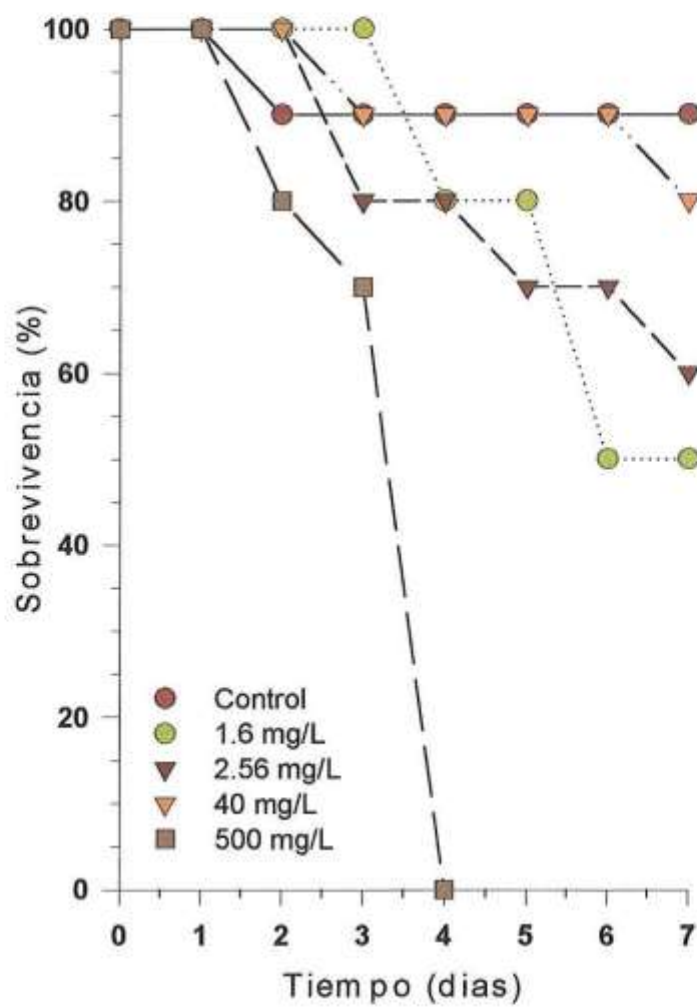


Figura 3. Curvas de toxicidad del experimento 1 con el pez mosquito *Gambusia affinis* sometido a diferentes concentraciones del fungicida Benlate®.

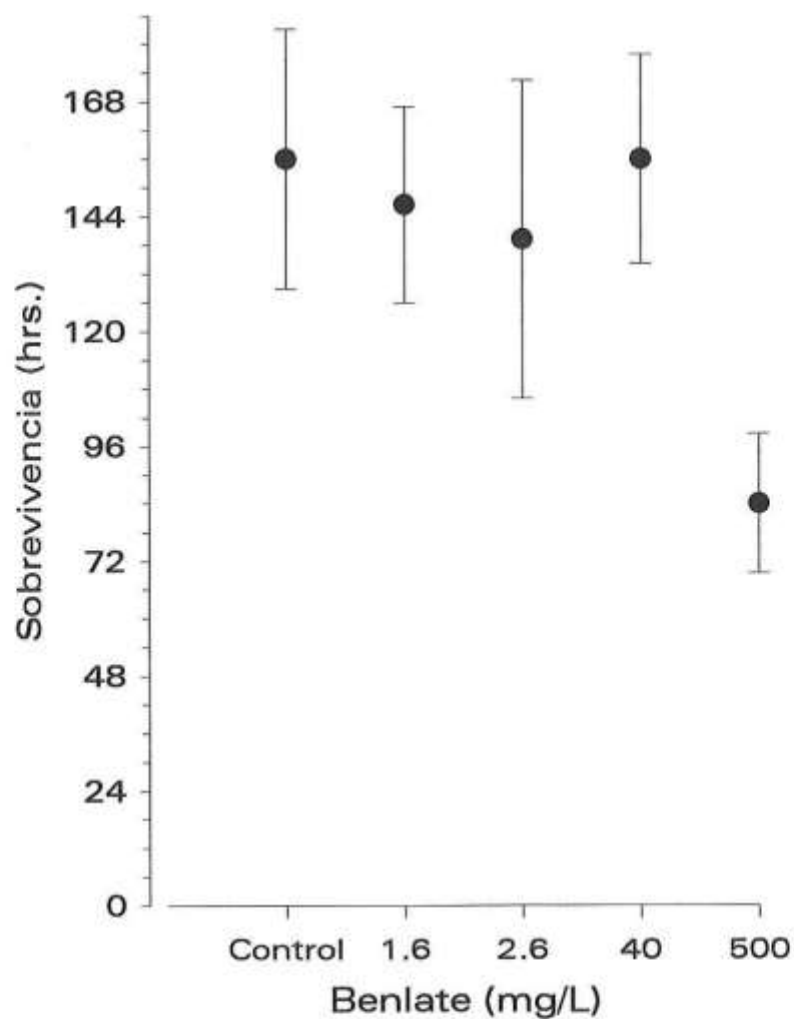


Figura 4. Tiempo de sobrevivencia de los peces mosquito *Gambusia affinis*, sometidos a diferentes concentraciones del fungicida Benlate®. Se muestra la media y los intervalos de confianza (95%).

Para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas entre el control y los tres tratamientos menores se practicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Como requisito para la práctica de esta prueba se establece que las varianzas deben ser homogéneas, por lo que se practicó la prueba de Bartlett para comprobarlo (sobrevivencia individual en horas / tratamiento), encontrándose que no existían diferencias estadísticamente significativas en las varianzas del control y los tres tratamientos más bajos: $\chi^2_{\text{Cal}}=2.509$ (3 g.l. al 0.05; $\chi^2_{\text{Esp}}=7.815$). El ANOVA practicado reveló, con un nivel de significancia del 0.05, que no había diferencias significativas: $F_{\text{Cal}}(3, 40)=0.22$, $p=0.879$, entre el control y los tres tratamientos más bajos.

Tanto los controles como los peces sometidos a 40 mg/L presentaron una media de supervivencia similar (156 horas), pero los controles presentan un intervalo de confianza mayor. La supervivencia media de los peces expuestos a 500 mg/L fue de 84 horas aproximadamente. El intervalo de confianza (I.C.) para esta dosis fue el más bajo de todos los tratamientos; contrario a los peces sometidos a la dosis de 2.6 mg/L, los cuales presentaron el I.C. más amplio (Fig. 4).

El análisis probit de todos los tratamientos, reveló que las dos dosis menores (1.6 y 2.6 mg/L), presentan un comportamiento paralelo, para los porcentajes de supervivencia; en cambio la concentración de 40 mg/L, tendió a presentar un comportamiento más agudo en función del tiempo (Fig 5).

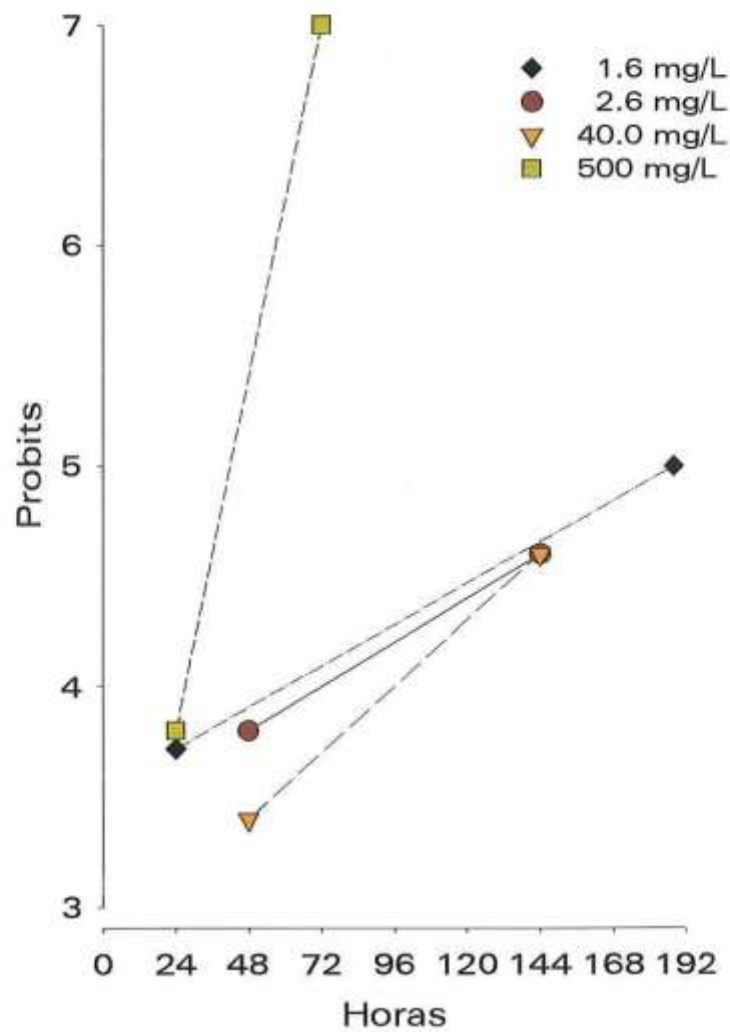


Figura 5. Líneas probit y porcentajes de sobrevivencia de los peces mosquito *Gambusia affinis* sometido a cuatro diferentes concentraciones del fungicida Benlate®.

Experimento 2. Efecto del fungicida Benlate® en la sobrevivencia de peces mosquito *Gambusia affinis* silvestres del Arroyo La Misión

Durante el segundo experimento destacaron dos aspectos: la muerte masiva, en menos de 14 horas, de los peces sometidos a la concentración mayor, y el aumento secuencial en la mortalidad presentada en los distintos tratamientos; el control no presentó mortalidad (Fig. 6).

En los tratamientos de 250 y 500 mg/L, se observó una diferencia marcada en el índice de mortalidad. En el tratamiento de 500 mg/L la mortalidad observada en los peces fue tres más rápida que la mortalidad de los peces sometidos a la concentración de 250 mg/L.

En los peces expuestos a las tres concentración menores (32, 63 y 125 mg/L), no se registró ningún sobreviviente después de las 72 horas. Los peces sometidos a la concentración menor (32 mg/L), tuvieron sobrevivencia hasta del 50% durante 48 horas, pero murió el 50% restante en las siguientes 24 horas.

En los controles no se registró ningún cambio notable durante todo el experimento. Al finalizar el experimento los peces fueron colocados durante otra semana en un acuario con agua limpia, aereación y alimento; no se registró mortalidad, por lo que fueron reintroducidos con los peces reservorios para ser utilizados en experimentos posteriores.

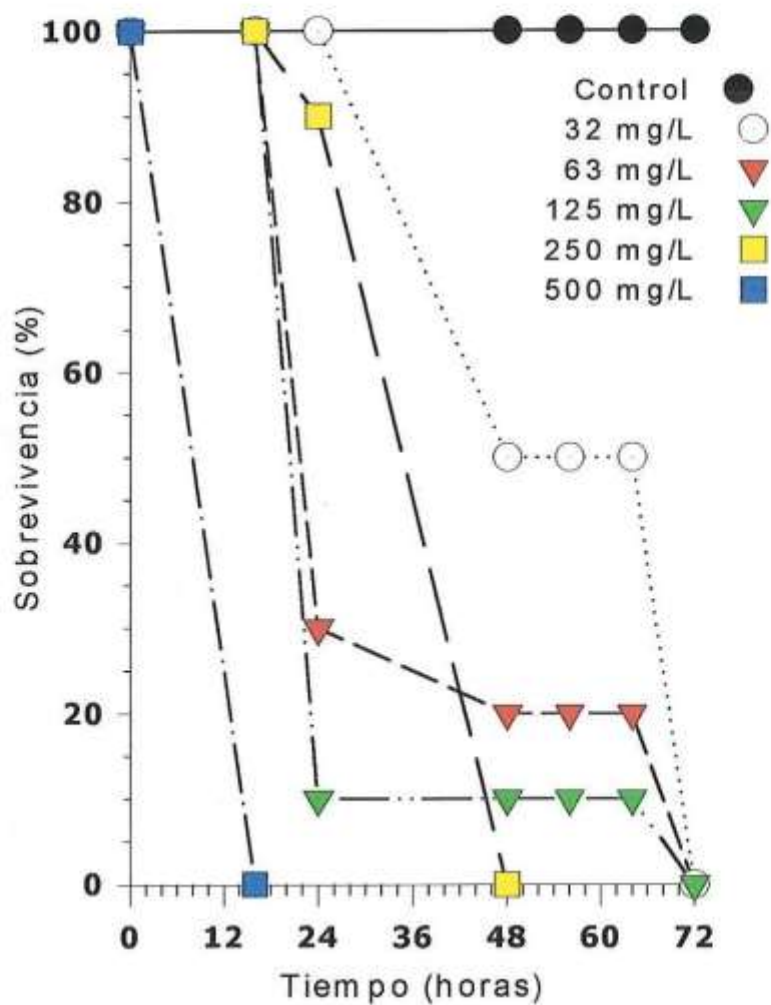


Figura 6. La gráfica muestra la mortalidad ocurrida durante el segundo experimento con el pez mosquito, sometido a diferentes concentraciones del fungicida Benlate®.

El análisis de la sobrevivencia (horas) individual/tratamiento (Fig. 7). indica que tres de los tratamientos tienen intervalos de confianza semejantes entre sí (15-18 horas, aproximadamente), aunque la media para la sobrevivencia fue diferente para estas tres concentraciones, tendiendo a ser menos en las mayores concentraciones. Para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas se practicó un análisis de varianza de una vía, pero antes se aplicó la prueba de Bartlett para establecer si las varianzas de los tratamientos eran iguales ($X^2_{Esp}=0.306$, al 0.05; $X^2_{Esp}=5.991$); el ANOVA practicado (3, 30) $F_{Cal}=4.39$; $F_{Esp}=3.32$, al 0.05 con 2 g.l., reveló que sí había diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

La cuarta concentración (250 mg/L) difirió de las tres concentraciones más bajas al presentar intervalos menores; aunque no como en la concentración mayor y en los controles en donde no hubo intervalos.

La gráfica probit de todos los tratamientos, revela un comportamiento paralelo en la toxicidad de las tres dosis menores, aunque la CL50 fue más rápida a mayor concentración (Fig. 9).

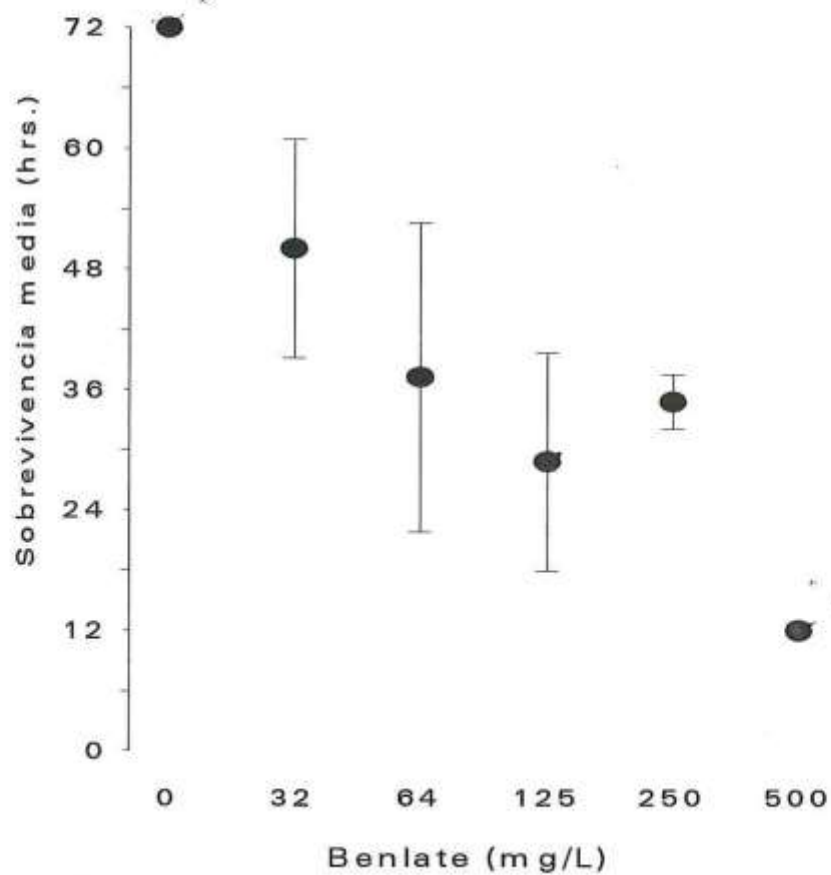


Figura 7. La gráfica muestra la media y los intervalos de confianza al 95% de cada tratamiento del experimento 2 con *Gambusia*.

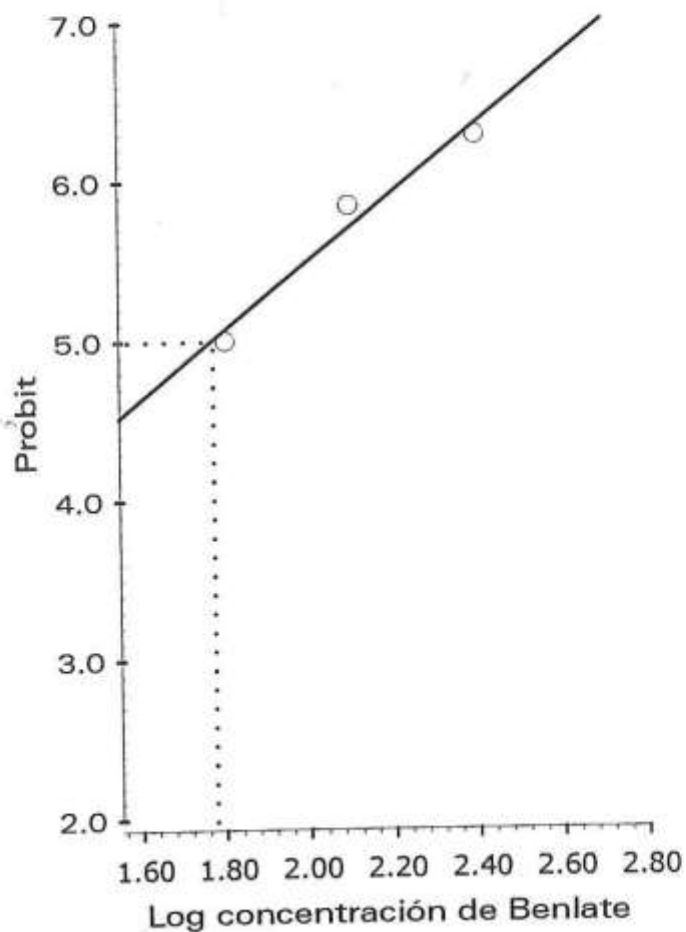


Figura 8. Cálculo de CL50 por interpolación de la gráfica probit. La línea intermitente paralela al eje X corresponde a una mortalidad del 50%; observe que la línea punteada sobre la recta inicia aproximadamente en el punto 5 de la escala probit. El punto de intersección fue aproximadamente de 1.778, (antilog igual 59.97 mg/L de Benlate®).

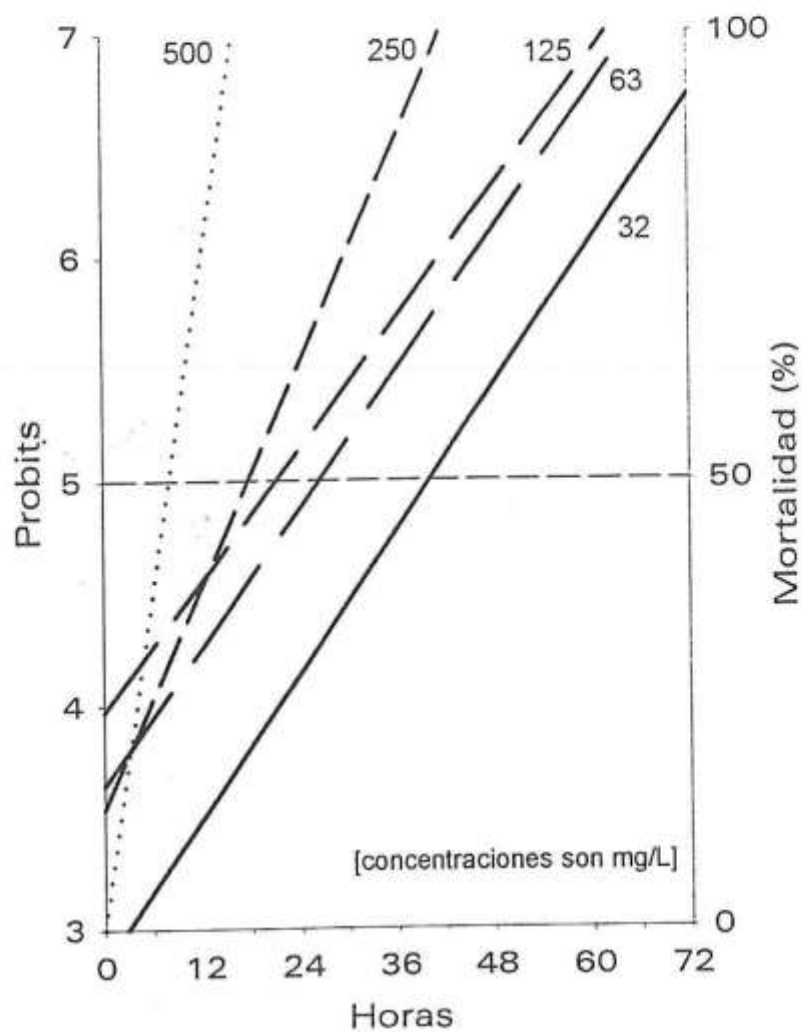


Figura 9. Gráficas probit para todos los tratamientos del segundo experimento. El número que aparece a la izquierda de las rectas corresponde a la concentración de Benlate® utilizada; la recta perpendicular a los ejes Y corresponde a la CL50; observe que los valores probit 5 y los de 50% de mortalidad son paralelos.

Determinación de la CL50

La determinación de la CL50 se hizo de dos formas: gráfica y matemática. Para el cálculo de la CL50 gráfica se utilizaron tres de los datos, ni los controles ni los tratamientos fueron tomados en cuenta porque en uno no hubo muertes y en el otro se registró el 100% de mortalidad. Los únicos tratamientos que fueron utilizados fueron los de 32, 63 y 125 mg/L. La figura 8 muestra la determinación gráfica de la CL50 por la técnica probit. La interpolación dio una CL50 igual a 1.778, sacando el antilogaritmo es igual a 59.97 mg/L).

TABLA VIII. Cálculo de los límites de confianza por el método de Litchfield-Wilcoxon

Benlate® (gr/L)	Log de [Benlate®]	Porcentaje de muertes/total	Proporción de muertes	Probit (teórico)
32	1.505	50%	0.5	5.0000
64	1.806	80%	0.8	5.8416
125	2.096	90%	0.9	6.2816

Interpolando la gráfica probit del experimento 2 con el pez mosquito *Gambusia affinis* se obtuvieron los valores para LC16, LC50 y LC84:

$$CL16 = 10^{1.465} = 29.17$$

$$CL50 = 10^{1.778} = 59.97$$

$$CL84 = 10^{2.221} = 166.72$$

$$\begin{aligned} S &= (LC84/LC50 + LC50/LC16) / 2 \\ &= [(2.221/1.778) + (1.778/1.410)] / 2 \\ &= (1.249 + 1.260) / 2 \\ &= 1.2541 \end{aligned}$$

$$N' = 20 + 20 + 20 = 60$$

$$\begin{aligned} f_{LC50} &= S^{2.77/\sqrt{N}} \\ &= 1.254^{2.77/\sqrt{60}} = 1.084 \end{aligned}$$

$$I.C.S. = LC50 * f_{LC50} = 59.97 \times 1.084 = 65.0$$

$$I.C.I. = LC50 / f_{LC50} = 59.97 \div 1.084 = 55.32$$

La interpolación gráfica arrojó una CL50 de 58.97 mg/L, mientras que el cálculo de los intervalos de confianza de la CL50, por el método de Lithfield-Wilcoxon, fue de 65.0 mg/L de Benlate® para el intervalo de confianza superior (I.C.S.) y de 55.32 mg/L, para el intervalo de confianza inferior.

Experimento 3. Peces mosquito *Gambusia affinis* sometidos a Benlate® con el propósito de evaluar micronúcleos

Se evaluaron durante tres días seis diferentes concentraciones (1, 2, 4, 8, 16 y 32 mg/L) del fungicida Benlate®; después de transcurridos los tres días, los sobrevivientes fueron colocados en acuarios con agua limpia; los acuarios utilizados para este fin fueron los mismos que antes contuvieron al pesticida, pero fueron lavados en dos ocasiones con agua y jabón antes de reintroducir a los peces sobrevivientes.

A partir del tercer día los individuos de los controles comenzaron a morir, alcanzando una mortalidad del 50% al finalizar el experimento, superando a la presentada por los peces sometidos a la dosis más baja (1 mg/L), los cuáles alcanzaron una sobrevivencia del 80% (Fig. 10).

Los peces sometidos a la segunda dosis (2 mg/L), presentaron un comportamiento semejante a los controles, debido a que las mortalidades registradas ocurrieron hasta el tercer día, después de ahí se incrementó de 10 a 40% en un lapso de 4 días de recuperación.

Los peces sometidos a la dosis de 4 mg/L, presentaron tendencias a la mortalidad muy semejante con el tratamiento de 2 mg/L; la única diferencia en ambos fue que en la concentración de 4 mg/L, las muertes sucedieron más rápido; lo mismo sucedió con los peces sometidos a la 8 mg/L (Fig. 11).

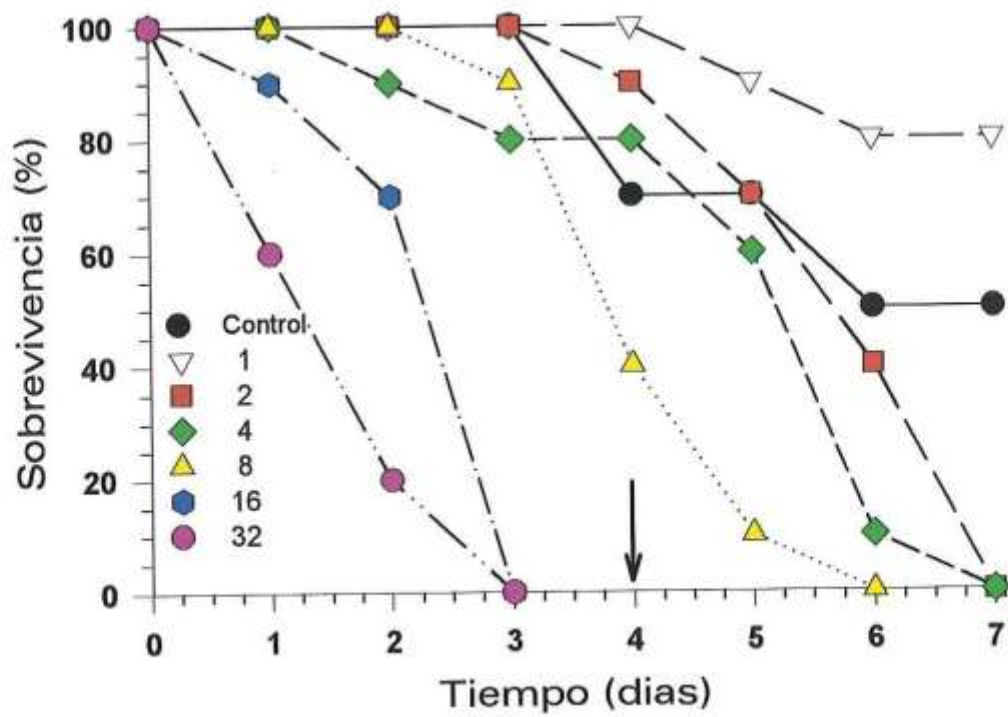


Figura 10. Curvas de toxicidad del pez mosquito *Gambusia affinis* sometido al fungicida Benlate®. La flecha señala el inicio del período de recuperación.

En los peces sometidos a las dos concentraciones mayores: 16 mg/L y 32 mg/L, no hubo sobrevivientes más allá del tercer día; la única diferencia que se presentó en ambas concentraciones, fue lo agudo que resultó la concentración de 32 mg/L, ya que se presentaron mortalidad diaria de un 40%.

En promedio los niveles de sobrevivencia observados en los peces sometidos a tratamiento, tendió a presentar mayor variabilidad en los peces sometidos a las dosis mayores. Cabe destacar que los controles presentaron un nivel de sobrevivencia parecido en los niveles de confianza (95%) que presentaban la tercera y cuarta dosis (4 y 8 mg/L).

Para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativa entre los tratamientos, se aplicó una prueba de varianza de una vía (ANOVA), pero previamente se utilizó la prueba de Bartlett para establecer si las varianzas eran homogéneas ($X^2=9.424$, con 6 g.l., al 0.05 de significancia). El ANOVA practicado ($F=30.72$, con 6 g.l. al 0.05; $p=0.000$), reveló que sí existían diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Una vez establecido lo anterior, se procedió a aplicar la prueba de Dunnett (Glantz 1990; Zar 1996) para establecer cuáles tratamientos diferían del control (ver TABLA IX)

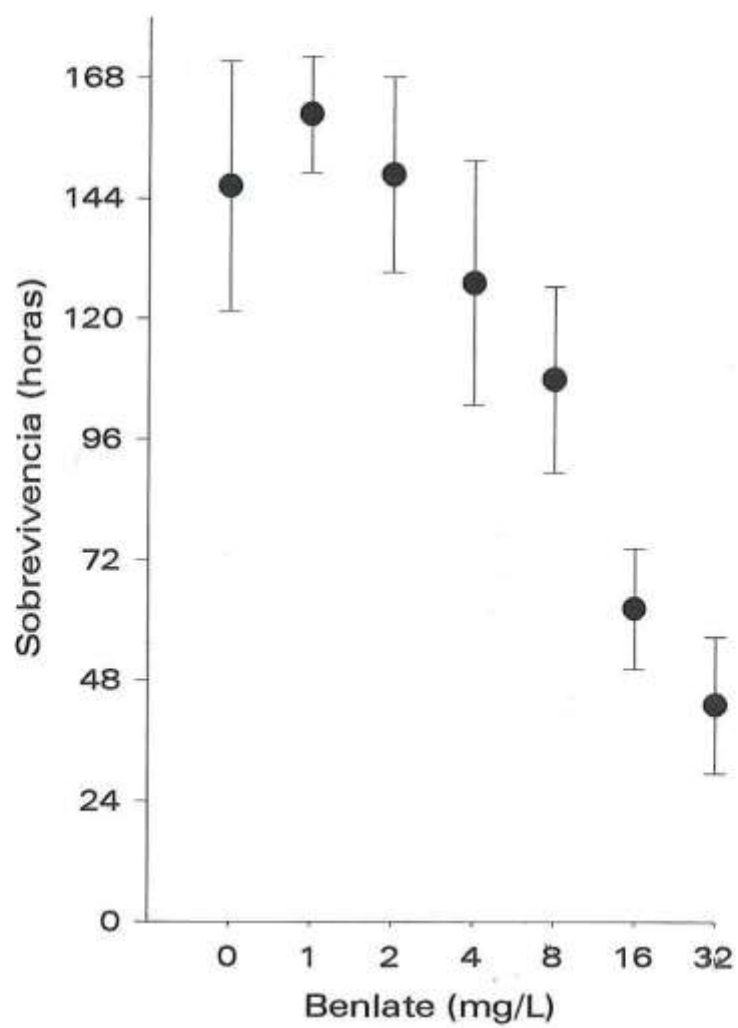


Figura 11. Intervalos de confianza al 95% de todos los tratamientos del experimento 3.

TABLA IX. Resultados de la prueba de Dunnett

Contraste	<i>T cal</i>	<i>T esp.</i> ($\alpha=0.05$ sig.)	Significancia
C vs. 1	0.946	2.29	No sig.
C vs. 2	0.157	2.29	No sig.
C vs. 4	1.420	2.29	No sig.
C vs. 8	2.990	2.29	Alta sig.
C vs. 16	6.150	2.29	Alta sig.
C vs. 32	7.570	2.29	Alta sig.

El contraste del control con los diferentes tratamientos, arrojó diferencias significativas para los tres tratamientos mayores (8, 16 y 32 mg/L), mientras que el análisis reveló que no existían diferencias significativas entre el control y los tres tratamientos menores (1, 2 y 4 mg/L).

La comparación de las líneas probit para cada tratamiento (Fig. 12), reveló que los tratamientos presentaron un comportamiento casi paralelo; únicamente difirieron entre sí en el tiempo en el que ocurrieron las muertes de los peces sometidos a esos tratamientos, presentándose ésta de forma más rápida en los peces sometidos a mayor concentración de Benlate®. Fue notable que la tendencia a la mortalidad no fue revertida cuando los peces fueron colocados en los acuarios de recuperación a las 72 horas de iniciado el experimento.

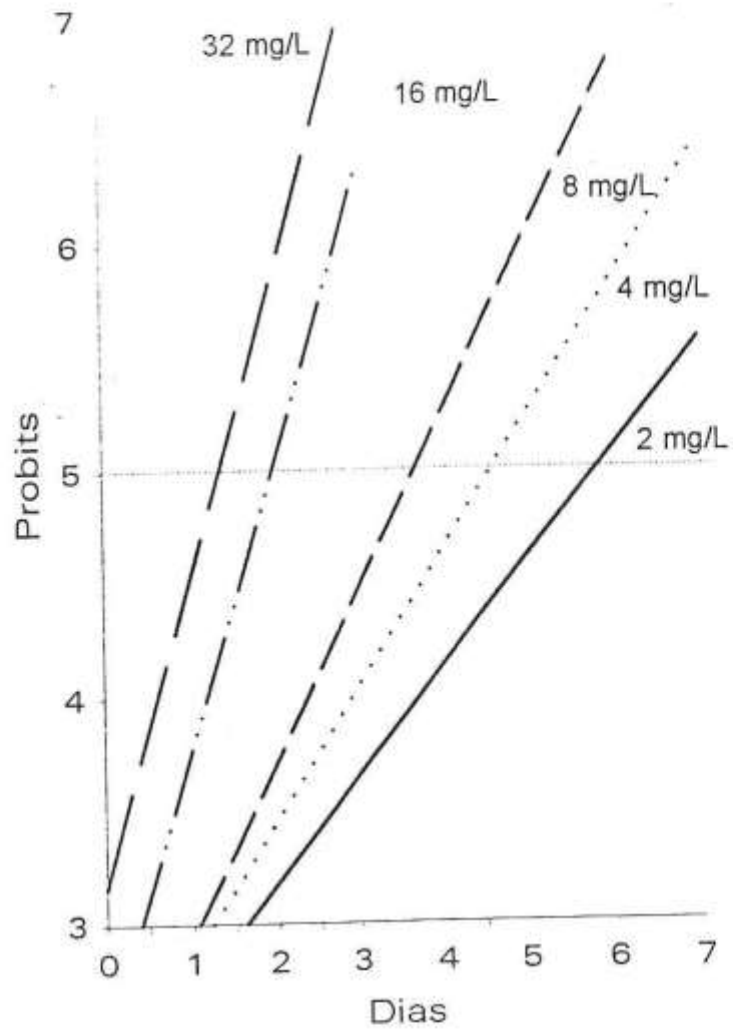


Figura 12. Líneas probit del experimento 3 con los peces mosquito *Gambusia affinis* sometidos a diferentes concentraciones del fungicida Benlate®.

Experimento 4. *Gambusia affinis* sometido a Benlate®

En el cuarto experimento se investigaron tres diferentes dosis del fungicida Benlate®: 2, 4 y 8 mg/L. Los peces estuvieron sometidos al fungicida durante 72 horas (3 días), tras los cuales los peces fueron colocados en baños de recuperación durante otros tres días.

En los controles se llegó a registrar hasta un 50% de mortalidad, cifra incluso mayor que las registradas para la concentración más baja de Benlate® (4 mg/L), los cuales alcanzaron un 60% de mortalidad. Los peces sometidos a 6 mg/L presentaron sobrevivencia menor que aquella de los controles (40%), pero el comportamiento de la curva de sobrevivencia en ambos fue muy semejante. Los peces sometidos a la mayor concentración (8 mg/L), presentaron un comportamiento similar durante todo el experimento, incluso la tendencia a la mortalidad no disminuyó al ser los peces transferidos a los baños de recuperación; ninguno de los peces sometidos a esta concentración sobrevivió (Fig. 13).

Para establecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre el control y los tres tratamientos, se procedió a practicar un ANOVA de una vía, evaluando previamente la homogeneidad de las varianzas utilizando la prueba de Bartlett: ($\chi^2_{Cal}=11.26$, 3 g.l.; $\chi^2_{Esp}=7.815$). Al determinarse lo inviable de aplicar el ANOVA paramétrico, se procedió a utilizar la contraparte no paramétrica, la prueba de Kruskal-Wallis ($H=3.370$, con 3 g.l.; $\chi^2_{Esp}=7.815$), el cual reveló que no había diferencias estadísticamente entre los diferentes tratamientos.

Para el control y los tratamientos de 4 y 8 mg/L, el tiempo de sobrevivencia media fue similar; el tratamiento más bajo tuvo una media ligeramente superior; la media tuvo una diferencia de 12 horas aproximadamente (Fig. 14).

Las líneas probit para los el control y las concentraciones de 4 y 8 mg/L (Fig: 15), revelan un comportamiento muy semejante durante los primeros días del experimento, pero esta situación se modificó al finalizar el experimento, poco después de iniciado el período de recuperación, cuando el mayor tratamiento comenzó a presentar mayores mortalidades, reduciendo así la CL50.

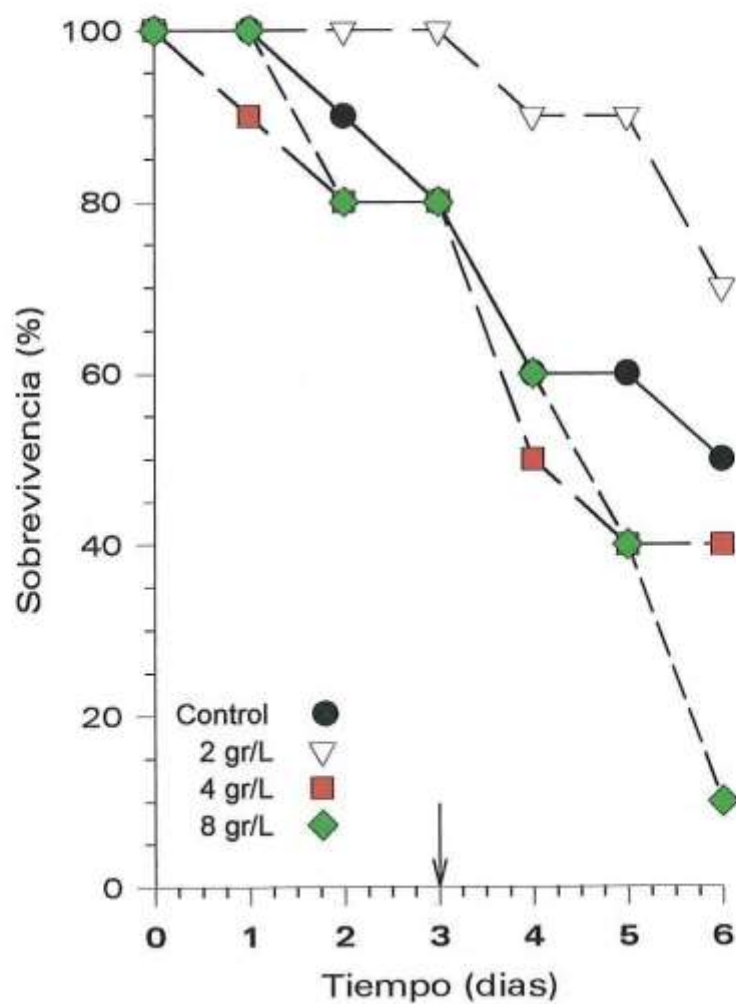


Figura 13. Curvas de toxicidad del cuarto experimento con el pez mosquito *Gambusia affinis* sometido al fungicida Benlate®; observe la flecha sobre el eje X que indica el inicio del periodo de recuperación.

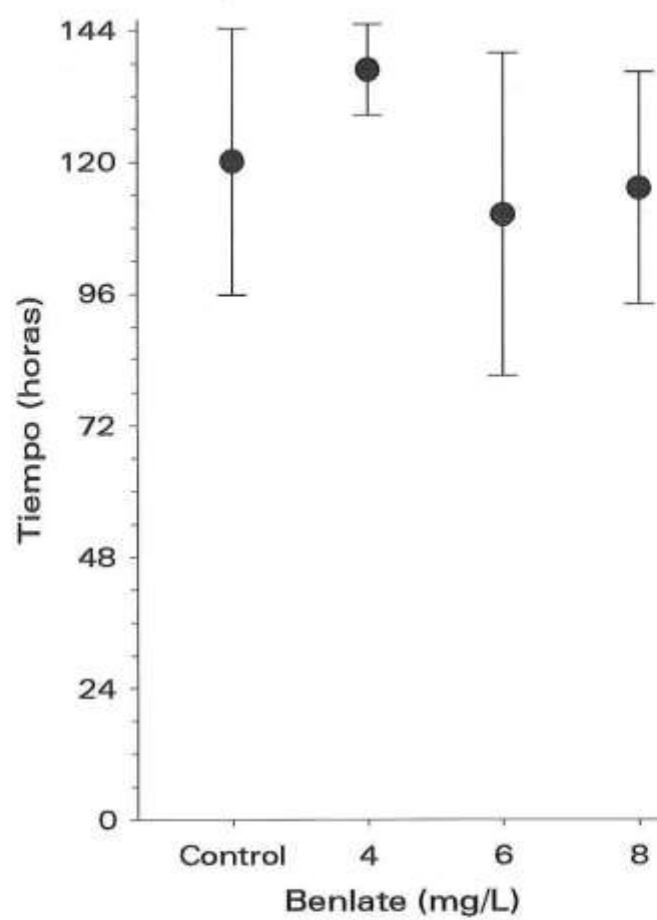


Figura 14. Intervalos de confianza (95%) del experimento 4 con el pez mosquito *Gambusia affinis* sometido a tres diferentes concentraciones de Benlate®.

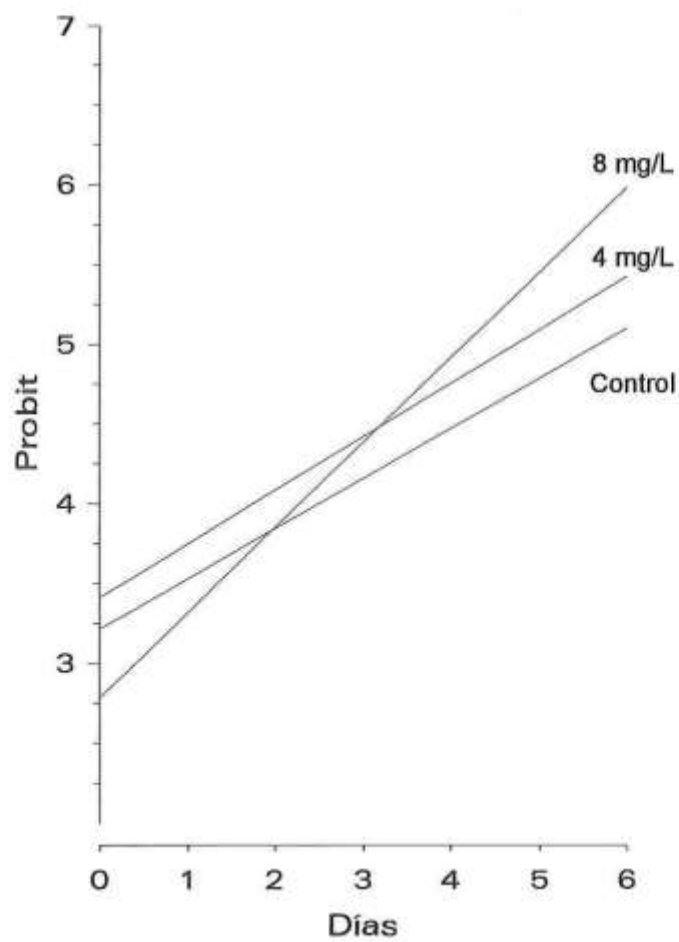


Figura 15. Líneas probit de supervivencia de los diferentes tratamientos y el control del experimento 4.

Experimento 5. Peces mosquito *Gambusia affinis* sometido a Benlate® (repetición de las exposiciones a concentraciones bajas)

En el quinto experimento se utilizaron dos de las concentraciones utilizadas en el cuarto experimento: 4 y 8 mg/L (Fig. 16). La mortalidad observada en los peces sometidos a los dos tratamientos principió después de que los especímenes fueron colocados en los acuarios con agua limpia. No se detectó muerte en los controles.

En la figura. 16 se aprecia un comportamiento paralelo en la mortalidad de los peces tratados hasta el quinto día, pero a partir de ese día, la muerte de los peces sometidos a la concentración mayor, sobrepasó a la muerte de los peces sometidos a 4 mg/L.

Para determinar si las diferencias entre los dos tratamientos que presentaron mortalidad (4 y 8 mg/L), en el tiempo de sobrevivencia individual eran estadísticamente significativas se practicó la prueba de Mann-Whitney ($T=510$; $p=0.00$), encontrándose que si existían diferencias significativas. Lo anterior también fue evidente en el tamaño de los intervalos de confianza para la sobrevivencia individual en horas (Fig. 17); el tratamiento de 4 mg/L posee un intervalo de confianza de 9.3 horas aproximadamente, mientras que los peces sometidos a la dosis mayor presentaron un intervalo de confianza mayor, siendo aproximadamente de 14 horas.

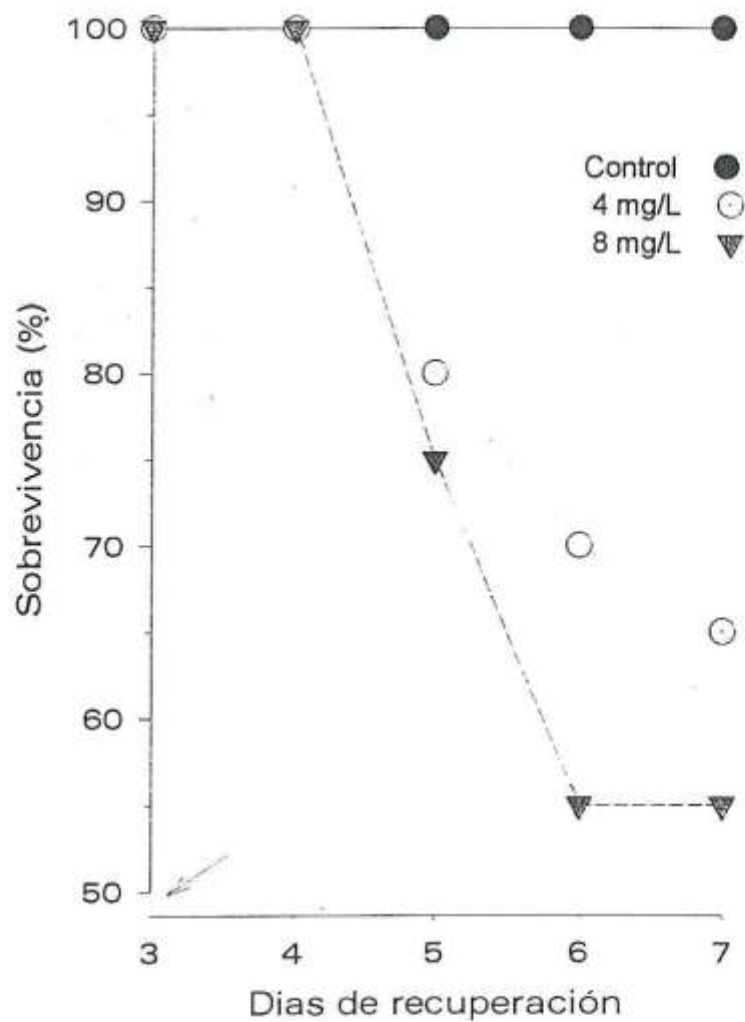


Figura 16. Curvas de toxicidad del experimento 5. Observe que el eje X comienza en el día 3; la flecha indica el inicio del periodo de recuperación.

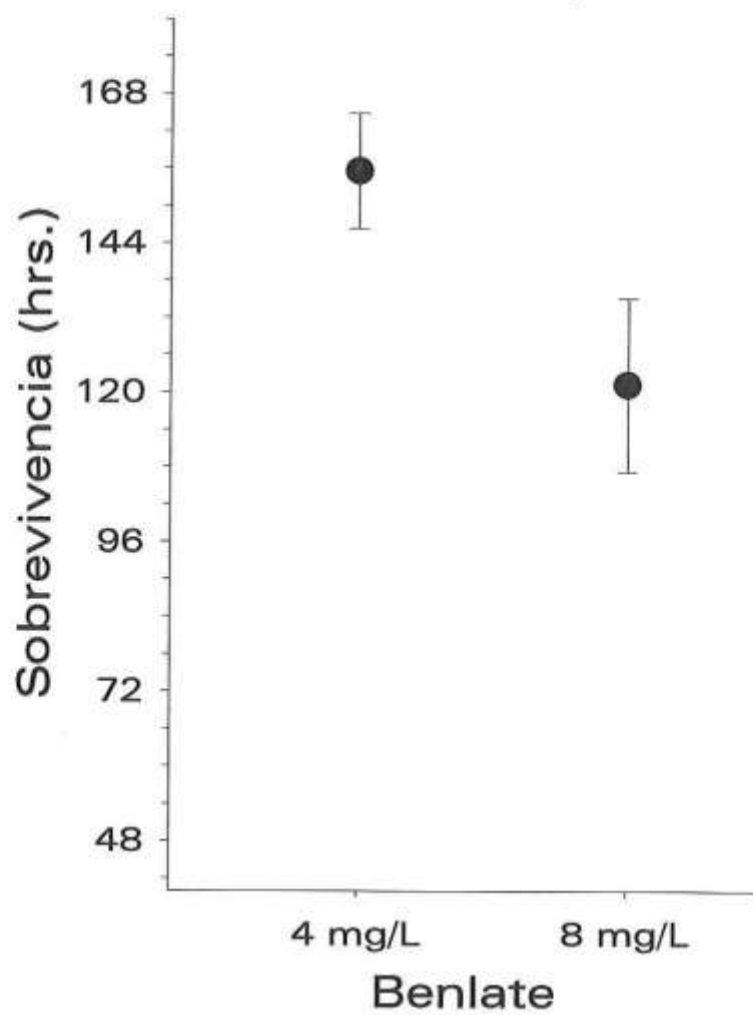


Figura 17. Intervalos de confianza 95% de los dos tratamientos del experimento 5 con el pez mosquito *Gambusia affinis*.

Experimento 6. Toxicidad del fungicida Benlate® en peces espada *Xiphophorus helleri* colectados en San Ignacio, B.C.S.

Se efectuó un experimento de toxicidad con el pez espada *Xiphophorus helleri* durante diez días, seis de los cuales (142 horas) los peces fueron sometidos a diferentes concentraciones del fungicida Benlate®, permaneciendo el tiempo restante en acuarios de recuperación (Fig. 18).

La mayor mortalidad de individuos se presentó en las dos concentraciones mayores, 125 y 250 mg/L, ningún pez sometido a la concentración mayor sobrevivió más allá de 96 horas. Los peces expuestos a 125 mg/L presentaron una sobrevivencia ligeramente superior (20%); en cambio a 63 mg/L se alcanzó un nivel de sobrevivencia del 40%. En los tratamientos restantes, así como el control, no presentaron casos de mortalidad (Fig. 18).

El tiempo de sobrevivencia media fue menor para los peces tratados con la concentración más alta; tienen también los intervalos de confianza más pequeños. En cambio, los peces expuestos a 63 y 125 mg/L presentaron intervalos de confianza similares (Fig. 19)

Cálculo de la CL50

El cálculo de la CL50 por interpolación gráfica a las 96 horas, fue igual a 2.252, calculando el antilogaritmo (Newman 1995) equivale a una concentración de 178.8 mg/L (Fig. 20).

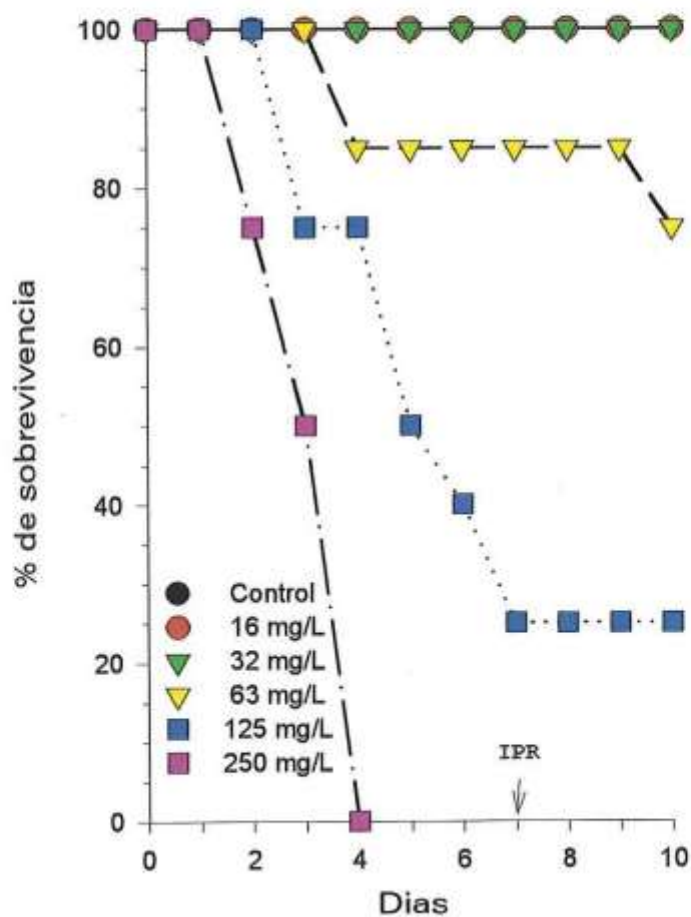


Figura 18. Gráfica de toxicidad del fungicida Benlate® en los peces espada *Xiphophorus helleri*, sometidos a diferentes concentraciones del fungicida Benlate®. Observe que los datos para la concentración de 16 y 32 mg, así como la del control están traslapadas. La flecha sobre el eje X indica el momento que inició el periodo de recuperación.

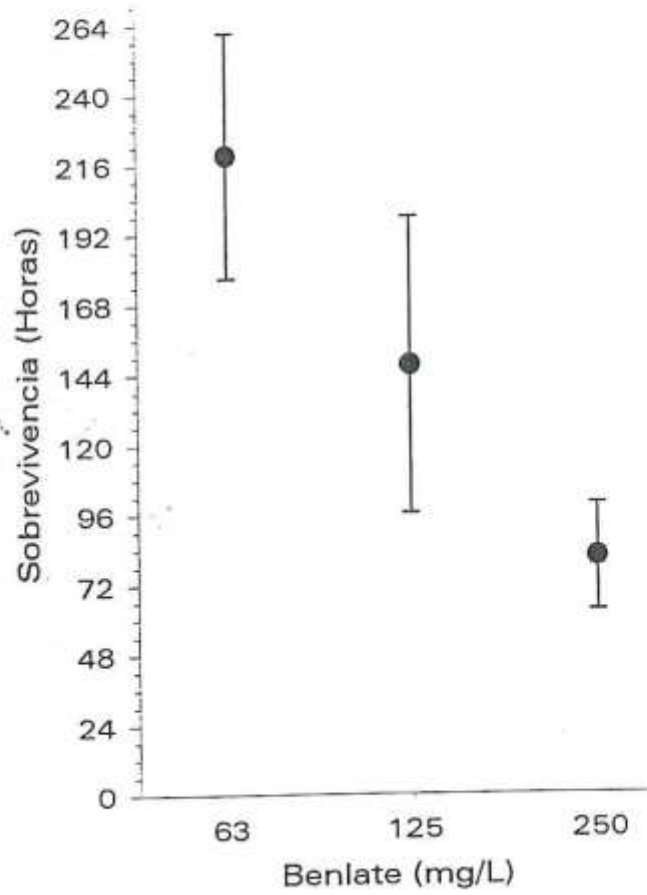


Figura 19. Gráfica de las tres concentraciones mayores de Benlate® utilizadas durante el experimento 6. Los puntos indican la supervivencia media (horas) de *Xiphophorus*, y los bigotes indican los intervalos de confianza (95%).

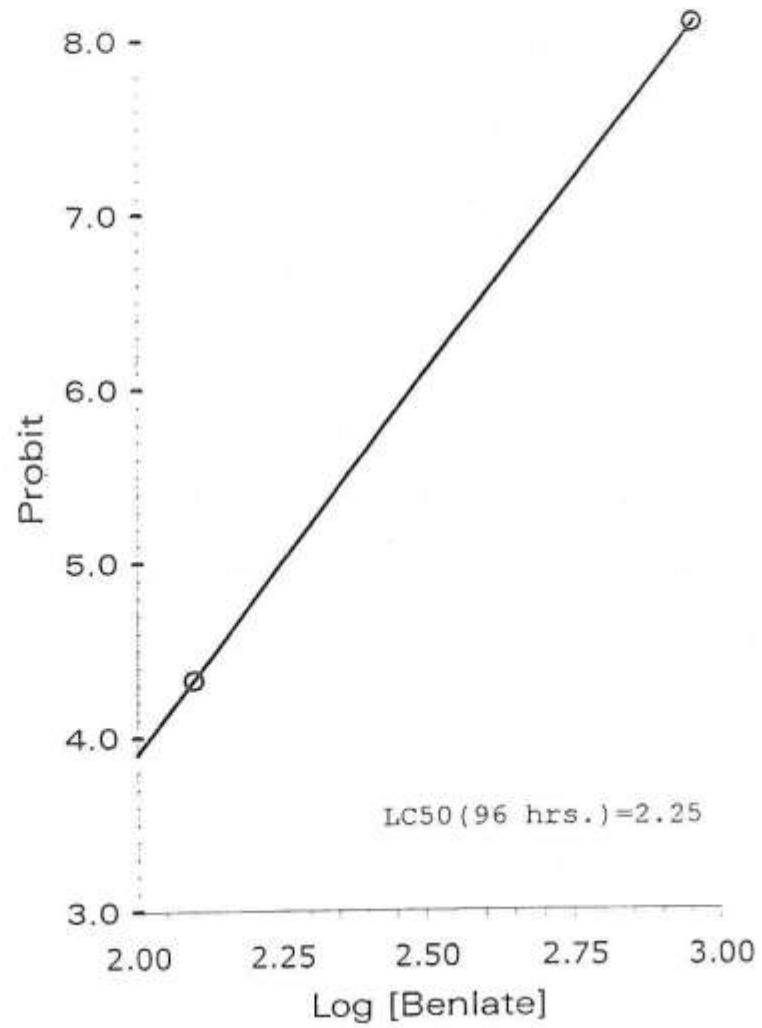


Figura 20. Cálculo de la CL50 por interpolación. Los puntos perpendiculares a X señalan el equivalente, en escala probit, a la muerte del 50% de los organismos a las 96 horas.

Experimento 7. Evaluación de efectos tóxicos y genotóxicos del fungicida Benlate® en concentraciones subletales en el pez espada *Xiphophorus helleri*

Los peces espada *Xiphophorus helleri* fueron sometidos a seis distintas concentraciones subletales del fungicida benlate: 1, 2, 4, 8, 16, y 32 mg/L, y un control. El experimento tuvo una duración de siete días, cuatro en exposición al fungicida (96 horas), y tres días en acuarios de recuperación.

El tamaño de los micronúcleos encontrados durante el análisis microscópico fue comunmente menor al del núcleo principal, éste fue aproximadamente de una quinta parte. Típicamente los micronúcleos encontrados presentaron un tamaño constante en los eritrocitos, siendo mucho más grandes los encontrados en los linfocitos.

Durante el experimento, no ocurrió mortalidad en ninguno de los peces utilizados. Al finalizar el período de recuperación se procedió a sacrificar a los peces para preparar las laminillas para la observación microscópica.

La frecuencia de micronúcleos en todos los tratamientos y el control fue baja, típicamente la frecuencia observada fue menor de 5 micronúcleos por cada 1,000 eritrocitos. A pesar de esta baja frecuencia registrada, se observó una tendencia a aumentar la frecuencias de los micronúcleos a mayor concentración. La respuesta individual a la producción de micronúcleos difirió a nivel intraespecífico. Este fenómeno fue más evidente en el análisis de los intervalos de confianza presentados por los diferentes tratamientos. Los intervalos de confianza entre algunos de los tratamientos son similares, especialmente entre el control y el tratamiento más bajo (1 mg/L) (Fig. 21).

Los peces presentaron diferencias intraespecíficas en el nivel de producción de micronúcleos en los distintos tratamientos a los que estuvieron sometidos. Así, mientras

que el intervalo de confianza para los controles fue el menor de todos, el mayor intervalo fue el de los peces tratados con la mayor concentración de Benlate®, 32 mg/L. En algunos casos, como los peces sometidos a 2, 4, 8 y 16 mg/L, los intervalos de confianza fueron muy semejantes entre sí. Para establecer si las diferencias encontradas eran estadísticamente significativas, se practicó la prueba de Kruskal-Wallis.

La curva de regresión practicada (Fig. 22) demuestra que la frecuencia media de micronúcleos tiende a aumentar conforme se incrementa la concentración del fungicida Benlate®.

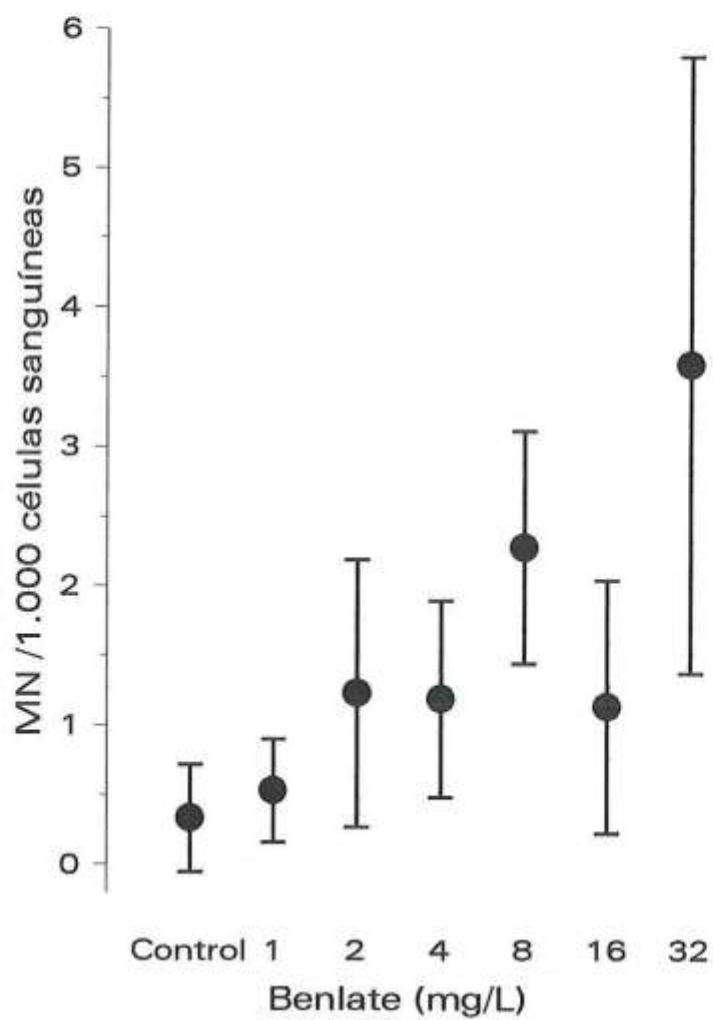


Figura 21. Intervalos de confianza al 95% de los diferentes tratamientos del experimento 7 con el pez espada *Xiphophorus helleri* sometido a seis diferentes concentraciones del fungicida Benlate®. Los bigotes representan la desviación estándar de la media.

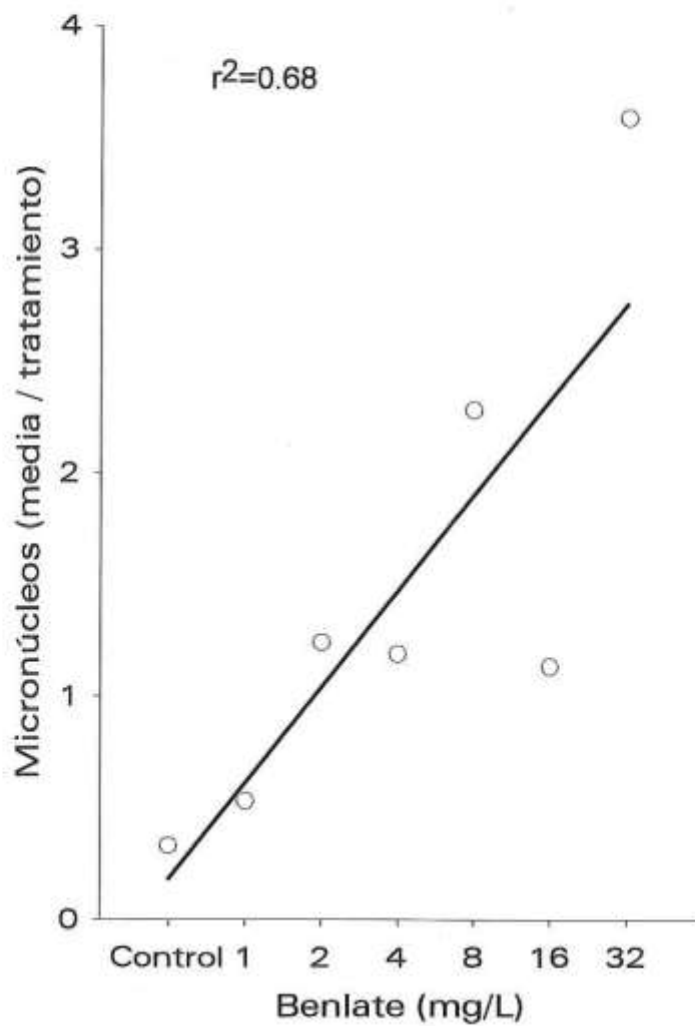


Figura 22. Regresión lineal de la frecuencia media de MN en los diferentes tratamientos del experimento 7 con peces espada *Xiphophorus helleri* sometidos a diferentes concentraciones del fungicida Benlate®. Los puntos son los valores medios de cada tratamiento.

Análisis estadístico de la frecuencia de micronúcleos

Para determinar si había diferencias entre los diferentes tratamientos, se practicó el análisis de varianza no paramétrico, la prueba de Kruskal-Wallis ($H_{cal}=22.897$, con 6 g.l.; $X^2_{Esp} = 12.592$), encontrándose que si existían diferencias estadísticas entre los tratamientos. Una vez establecida la diferencia entre los tratamientos, se procedió a aplicar la prueba de Dunn para conocer específicamente cuáles tratamientos difirieron entre si (TABLA X).

La prueba de Dunn reveló que solamente ocurrían diferencias estadísticamente significativas en algunos de los pares de tratamientos contrastados: C vs. 8, C vs. 32, 1 vs. 8, 1 vs. 32, 2 vs. 8, 2 vs. 32 mg/L de Benlate®; ocurriendo esta solamente entre los contrastes más extremos, pero no entre tratamientos más cercanos entre si (TABLA X).

Análisis estadístico de la muerte celular (necrosis)

Por otra parte, para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas en el índice de muerte celular ocurrido entre los tratamientos y el control, se aplicó la prueba de Krukal-Wallis, ($H= 7.967$, 6 g.l., $X^2_{Esp} = 12.592$). Con base en los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, se establece que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los diversos tratamientos para la muerte celular.

TABLA X. Contraste entre pares de tratamientos con la prueba de Dunn

Tratam.	N1	n2	Ri1	Ri2	N(N+1)/12	Dunn esp. (0.05)	Dunn cal.	Signif
C vs 1	9	17	32.5	37.5	927.5	2.576	0.398	No Sig.
C vs 2	9	13	32.5	40.0	927.5	2.576	0.568	No Sig.
C vs 4	9	16	32.5	51.0	927.5	2.576	1.458	No Sig.
C vs 8	9	18	32.5	71.3	927.5	2.576	3.121	A.S.
C vs 16	9	15	32.5	47.2	927.5	2.576	1.145	No Sig.
C vs 32	9	17	32.5	71.5	927.5	2.576	3.106	A.S.
1 vs 2	17	13	37.5	40.0	927.5	2.576	0.223	No Sig.
1 vs 4	17	16	37.5	51.0	927.5	2.576	1.273	No Sig.
1 vs 8	17	18	37.5	71.3	927.5	2.576	3.282	A.S.
1 vs 16	17	15	37.5	47.2	927.5	2.576	0.899	No Sig.
1 vs 32	17	17	37.5	71.5	927.5	2.576	3.255	A.S.
2 vs 4	13	16	40	51.0	927.5	2.576	0.967	No Sig.
2 vs 8	13	18	40	71.3	927.5	2.576	2.823	A.S.
2 vs 16	13	15	40	47.2	927.5	2.576	0.623	No Sig.
2 vs 32	13	17	40	71.5	927.5	2.576	2.807	A.S.
4 vs 8	16	18	51	71.3	927.5	2.576	1.940	No Sig.
4 vs 16	16	15	47.2	51.0	927.5	2.576	0.347	No Sig.
4 vs 32	16	17	51	71.5	927.5	2.576	1.933	No Sig.
8 vs 16	18	15	47.2	71.3	927.5	2.576	2.264	No Sig.
8 vs 32	15	17	71.3	71.5	927.5	2.576	0.019	No Sig.
16 vs 32	17	17	47.2	71.5	927.5	2.576	2.326	No Sig.

Análisis genotóxico y citotóxico del experimento 5 con el pez mosquito *Gambusia affinis*

El análisis microscópico de la sangre de los peces sobrevivientes del experimento 5 con *Gambusia*, reveló un decremento aparente en la frecuencia de micronúcleos de los peces tratados con 4 y 6 mg/L del fungicida Benlate®, con respecto a los controles (Fig. 23); además, el error estándar de ambos tratamientos fue muy semejante entre ambos tratamientos.

Para establecer si los valores de las diferencias encontrada en los tratamientos y el control son estadísticamente significativas se practicó la prueba de Kruskal-Wallis ($H=3.560$, 2 g.l., $p=0.169$, al 0.05 de significancia; $X^2_{Exp}=5.991$), la cual indicó que no había diferencias entre el control y los dos tratamientos para la producción de micronúcleos.

Muerte celular (necrosis)

El análisis de la frecuencia de necrosis presentado por los dos tratamientos y el control (Fig. 24), reveló, al igual que con los micronúcleos, una aparente disminución en los valores medios de necrosis en los peces sometidos al fungicida Benlate®. Al igual que con los micronúcleos, se practicó la prueba de Kruskal-Wallis ($H=0.893$ 2 g.l., $p=0.640$, al 0.05 de significancia; $X^2_{Exp}=5.991$) para establecer si había diferencias estadísticamente significativas. El resultado de la prueba de Kruskal-Wallis indicó que no hubo diferencias significativas entre el control y los dos tratamientos para la muerte celular observada (Figs. 25 - 28).

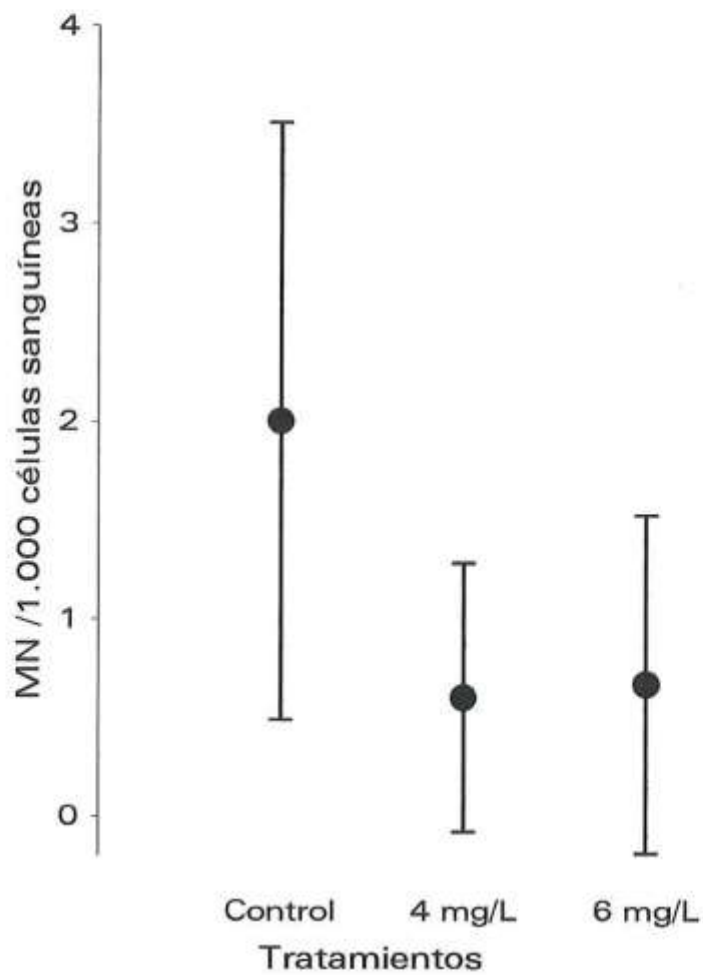


Figura 23. Frecuencia media e intervalos de confianza de micronúcleos (MN) del experimento 5 del pez mosquito *Gambusia affinis* sometido a dos concentraciones del fungicida Benlate®.

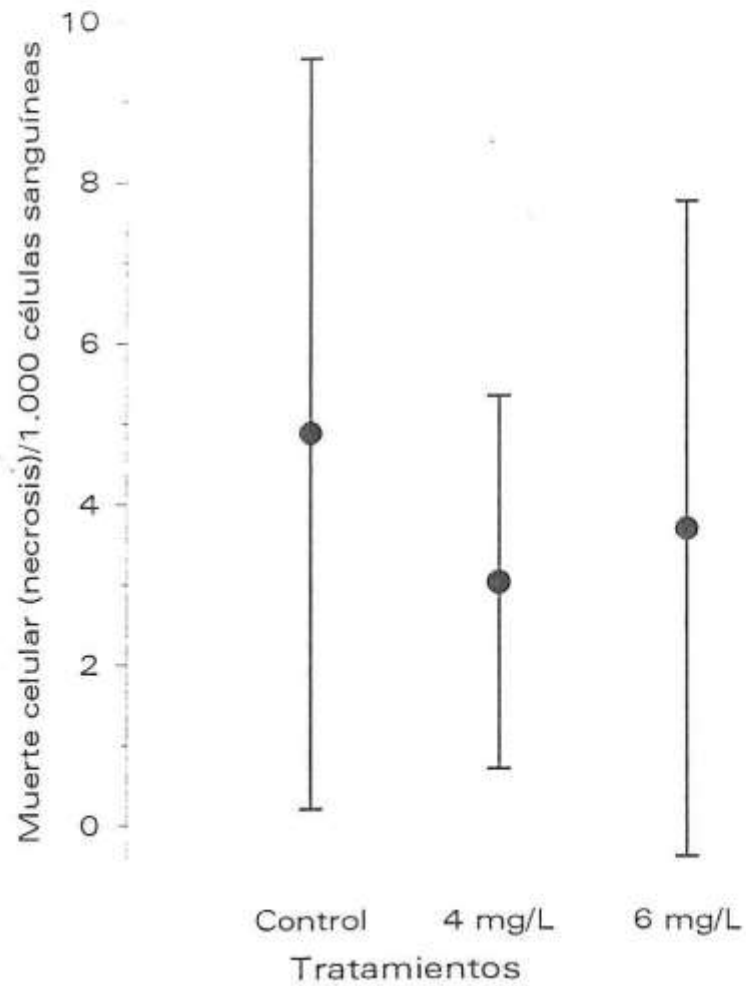


Figura 24. Media e intervalo de confianza del experimento 5 con el pez mosquito *Gambusia affinis* y el fungicida Benlate®.

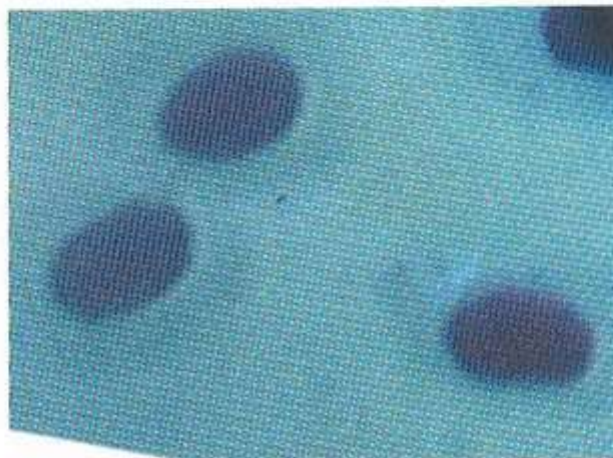


Fig. 25. Eritrocito normal. Tinción con Giemsa.



Fig. 26. Eritrocito de pez con un micronúcleo. El micronúcleo está junto a un núcleo y al interior de la membrana plasmática. Tinción con Giemsa.



Fig. 27. Un núcleo normal y otro con necrosis. Observe la forma reticulada de la cromatina.



Fig. 28. Núcleo necrótico con agujeros típicos de una degradación celular.

DISCUSIÓN

El biomonitoreo

El presente trabajo corrobora la utilidad de los seres vivos, en especial los peces, para conocer los efectos de las sustancias químicas en ambiente acuáticos. Los peces son muy importantes en esta clase de estudios por dos razones: 1) ocupan un lugar preponderante en las cadenas tróficas, y 2) debido a su alto metabolismo, requieren de grandes cantidades de oxígeno, el que sustraen de su entorno, lo que a su vez facilita el paso de grandes cantidades de tóxicos por sus bránquias. Esta característica es especialmente importante cuando se trata de conocer el efecto de sustancias que ocurren en cantidades traza en el ambiente acuático (Al-Sabti 1991)

El biomontoreo puede efectuarse de dos formas: en laboratorio o *in situ*. cada uno ofrece sus propias ventajas y desventajas. Con el biomonitoreo *in situ* pueden ser estudiadas aquellas sustancias que tienen comportamientos más complejos, como el sinergismo (Solbé 1979) y otras modificaciones que sufren en el medio y que no son sencillas de reproducir en condiciones de laboratorio (Adams 1990). Con este tipo de estudios se pretende detectar las variables relacionadas con el estrés y, a su vez,

tar el poder predictivo de los resultados (Adams 1990). Sin embargo, aún no es raro encontrar en la literatura discrepancias en los datos obtenidos con algún sistema de prueba específico, lo que ha hecho necesario el desarrollo de pruebas estándares para hacer efectivo el biomonitoreo (Baudo *et al.* 1995).

En el presente trabajo, los resultados obtenidos con el pez mosquito *Gambusia affinis* y con el pez espada *Xiphophorus helleri*, han confirmado la utilidad de los peces en los trabajos de biomonitoreo, en particular en los trabajos de toxicidad aguda y mutagénesis. La clase *Osteichthyes*, o peces óseos, representan a la clase de vertebrados más abundantes. Ésta clase es la que cubre el mayor número de ambientes, lo que sitúa a los peces como los organismos ideales para estudios ambientales (Powers 1989). A pesar de las ventajas enumeradas, han surgido algunos cuestionamientos válidos, respecto al uso exclusivo de peces como biomonitores, en especial las críticas se han centrado en la falta de realismo de algunas conclusiones hechas, y al poco poder de extrapolación de los resultados a nivel de ecosistema. Sin negar esta postura, Adams (1990) plantea que la experimentación con peces sigue siendo útil, sobre todo porque constituyen una primera señal de alarma. Sin embargo, el creer que una sola especie por sí misma, sea pez o no, es más sensible que el resto, y que por sí sola dará respuesta a todas las preguntas, es un mito que tiende a desaparecer (Cairns 1986). Sin embargo, éste enfoque tardó cincuenta años en ser aceptado, ya que en los primeros estudios se buscó, inutilmente, una especie ideal, lo que llevó a malas prácticas de manejo. No existe ningún organismo que de respuesta a todas las preguntas acerca de un ecosistema, ni siquiera que evalúe con certeza los efectos del nivel trófico al que pertenece (Cairns, 1986).

Tomando en cuenta lo anterior, los estudios con peces deberán tomarse con cautela, sobre todo deberá conocerse lo más posible sobre la biología del pez, es decir si es migratorio o si recorre grandes distancias diariamente (Root 1990). Así, esta clase de estudios constituyen, a lo sumo, una primera aproximación al problema de los xenobióticos en los ecosistemas, sobre todo aquellos que tienden a fluctuar en el espacio y en el tiempo (Root, 1990).

CL50 y los factores fisicoquímicos

La toxicidad de los pesticidas está en función de la sustancia en si, y de las condiciones que prevalezcan cuando es aplicado. En el caso de los factores físicos y químicos presentes en el agua, destacan el espacio, el flujo del agua, la temperatura, el oxígeno disuelto, la luz disponible, el pH, y la dureza. En los experimentos que se llevaron a cabo en este trabajo, pudieron ser medidos seis diferentes parámetros al inicio y al final de cada uno de los experimentos, éstos fueron: oxígeno disuelto, porcentaje de saturación de oxígeno, dureza del agua, pH, conductividad eléctrica, y temperatura (Fig. 2). En todos los experimentos se registró poca variación en los parámetros medidos, exceptuando dos de ellos que presentaron una pequeña disminución del oxígeno disuelto. Este hecho es de suma importancia para la interpretación de los resultados, ya que de haberse presentado grandes variación en algunos parámetros, hubiese sido necesario tomarlos en cuenta para la interpretación. Por ejemplo, se sabe que el aumento en la dureza del agua de 10 a 1,000 disminuye la toxicidad del cromo y del zinc en un factor de 5. Es conocido que lo contrario también es cierto para otros metales, a menor dureza

mayor toxicidad (Crompton 1997). La disminución de la temperatura también puede afectar la toxicidad incrementándola, como el sulfuro de hidrógeno (H_2S), del cual se requiere una menor cantidad para alcanzar la CL50 (400 $\mu g/L$ a 6 °C y 530 $\mu g/L$ a 4 °C) en *Carassius auratus* (Adelman y Smith 1972).

Otro factor físico que afecta la toxicidad es el espacio, el cual debe ser tomado en consideración para establecer la toxicidad de una sustancia. Sprage (1969) y Abel y Axiak (1991) establece que minimamente se debe tener una relación en el volumen de agua utilizado en los experimentos de 1 L/cm de pez; o 2 L/1 gr de pez (Crompton 1997). En los experimentos llevados a cabo con *Xiphophorus* y *Gambusia*, la relación de agua / pez (peso o longitud) fue mayor para *Gambusia* debido a su menor tamaño, y menor peso; por lo tanto tuvieron una mayor cantidad de pesticida disponible por pez. A pesar de lo anterior, es difícil concluir con la evidencia de qué se dispone que esta fue la causa de la mayor mortalidad de peces mosquito observada. La diferencia intraespecífica puede deberse a factores distintos al espacio, por ejemplo en el trabajo efectuado con Benomyl, Palawski y Knowle (1986) encontraron diferencias intraespecíficas en el nivel de respuesta observada en los alevines de tres diferentes especies de peces de agua dulce, expuestos a variaciones en el pH, $CaCO_3$, y temperatura, a pesar que los alevines tenían peso y longitudes muy similares. Sin embargo, en las tres especies detectaron que se requería de menores concentraciones de Benomyl para alcanzar la CL50 a 96 horas cuando la temperatura, la dureza y el pH de la solución era disminuida. A pesar de que en el presente trabajo los parámetros fisicoquímicos fueron medidos úni-

camente al inicio y al final del experimento, no se registraron fluctuaciones marcadas en ellos.

Otros factores que deben de ser tomados en cuenta para establecer si los efectos encontrados pueden ser únicamente atribuidos a la sustancia probada, son la edad y la condición de los peces. En este estudio no fueron efectuados estudios de la condición de los peces, sin embargo en ninguno de los peces de reserva se registraron mortalidades masivas (>20%) suficientes para descartar a los peces para experimentación toxicológica, como lo recomiendan Abel y Axiak (1991). Cabe sin embargo destacar el hecho de que en los peces machos presentaron una disminución en el peso. Este adelgazamiento probablemente se originó por las luchas entre macho por territorio, y no necesariamente por carencia de alimento ya que este era dispersado en toda la superficie del acuario, además de ser suministrado en cantidades suficientes. Este comportamiento territorial fue más observado en los peces espada. Durante los experimentos no se determinó el tiempo de mortalidad por sexo, pero se observó un descenso en la actividad natatoria y en la mortalidad en los machos. Por otra parte, la edad de los peces no se tomó en cuenta ya que los peces fueron extraídos al azar del acuario principal y de nuevo distribuidos al azar entre los tratamientos conforme eran capturados.

El análisis probit

La estimación de la dosis media letal (CL50) del experimento 2 con el pez mosquito *Gambusia affinis*, reveló CL50 de 59.97 mg/L, a las 24 horas; no se pudo estimar la CL50 a 96 horas, porque no se podía aplicar la técnica para ese tiempo. Por otra parte,

dosis utilizadas las curvas presentaron un comportamiento paralelo, lo que indica que en éstos tres tratamientos puede esperarse un comportamiento menos agudo en los porcentajes de mortalidad registrados. No obstante, en dos de las dosis intermedias (63 y 125 mg/L) las líneas probit fueron paralela entre si, indicando una respuesta casi igual en los dos grupos de peces.

El cálculo de la CL50 para los peces espada *Xiphophorus helleri* solamente pudo llevarse acabo con dos de los datos a las 96 horas. Esto se debió a que los peces sometidos a la dosis mayor ya habian muerto para entonces, en tanto que los peces sometidos a las dos dosis menores (16 y 32 mg/L), no habian muerto en ese momento. De hecho, no presentaron muerte alguna durante todo el experimento. Aunque la técnica probit recomienda tener el mayor número de datos posible para establecer con seguridad los limites de confianza, los resultados de la CL50 (178.6 mg/L a las 96 horas) pueden ser tomados en cuenta, aunque con cautela. Debido a la poca disponibilidad de datos, se prefirió no estimar los intervalos de confianza con el método de Lithfield-Wilcoxon. En estas condiciones, lo ideal habria sido experimentar con un rango de concentraciones de Benlate® menores, pero no se pudo efectuar esto debido a la poca disponibilidad de peces.

Contraste de la respuesta ante Benlate® de *Gambusia* y *Xiphophorus*

Los resultados toxicológicos encontrados en los experimentos con el pez mosquito *Gambusia affinis* y el pez espada *Xiphophorus helleri*, revelaron que el pez mosquito es más susceptible a Benlate® que el pez espada. Para ninguna de las dos especies se encontró información bibliográfica de toxicidad de Benlate®. Sin embargo los resultados encontrados concuerdan con la ficha técnica que describe a Benlate® como altamente tóxico para los peces, aunque no establece cual es la causa (Benomyl Health and Safety Guide, 1993). A pesar de lo anterior, ambas especies resultaron mucho más resistentes a Benlate® que otras especies en la que se han efectuado estudios (TABLA V); aunque debe de tomarse en cuenta que dicha tabla hace referencia básicamente a individuos jóvenes.

Por otra parte, se observó una respuesta diferencial entre los peces *Gambusia* ya disponibles en el bioterio, los cuáles habían permanecido en condiciones de cautiverio por cuatro generaciones y los peces silvestres capturados en el Arroyo La Misión para éstos experimentos. Los peces del bioterio sometidos a la mayor dosis de Benlate® con la que se trabajó (500 mg/L) tardaron hasta 96 horas para morir el 100% (Experimento 1), mientras que los peces capturados en La Misión solamente bastaron 16 horas para que muriera el 100% (Experimento 2). El análisis de los factores fisicoquímicos no reveló diferencias marcadas entre ambos experimentos. Por lo anterior, la causa más probable de la respuesta diferencial en ambos grupos de peces fue que los silvestres nunca antes fueron expuestos a la manipulación siendo más susceptibles al estrés provo-

cado por el recambio diario del agua. Dicho estrés probablemente tuvo efectos sinérgicos con el fungicida para precipitar la muerte.

Respecto al tercer experimento no se registró ninguna diferencia entre los promedios de sobrevivencia para los peces sometidos a 16 mg/L y aquellos sometidos a 32 mg/L; ningún pez sobrevivió más allá de las 72 horas. En cambio, en las tres dosis menores siguientes (2, 4 y 8 mg/L) se registró una sobrevivencia cercana al doble del tiempo; entre el menor tratamiento y el control no se registraron diferencias significativas, sobreviviendo un 80% en el primero, y un 60% en el segundo.

El análisis de los resultados del experimento 4, en donde se ensayaron tres concentraciones de Benlate® (2, 4 y 8 mg/L), reveló un comportamiento distinto para el tratamiento mayor (8 mg/L), ya que en el experimento 3 no sobrevivió ningún pez después del tercer día, mientras que los peces de los experimentos 4 y 5 si sobrevivieron más tiempo.

En los experimentos en donde los peces sometidos a Benlate® fueron colocados en acuarios de recuperación no se registró ninguna disminución en la tendencia a la mortalidad. La más probable respuesta a este fenómeno es que Benlate® provoca daños irreversibles en los peces mosquito *Gambusia affinis*, en cambio en los peces espada *Xiphophorus helleri* (Experimento 6, Fig 18) que fueron sometidos al baño de recuperación, éste si fue efectivo para detener la mortalidad (dosis de 125 mg/L, Fig. 18).

Debido a la poca disponibilidad de peces espada *Xiphophorus helleri*, no fue posible efectuar tantos experimentos como con *Gambusia affinis*, sin embargo el único experimento de toxicidad llevado a cabo con esta especie, reveló que *Xiphophorus* es una

especie más resistente que *Gambusia*, bajo las condiciones experimentales con las que se trabajó. Por ejemplo en el pez espada no ocurrieron muertes entre los controles, así como tampoco en la dosis más baja utilizada (16 mg/L). Respecto a la variación intraespecífica, esta fue menor para los peces sometidos a las concentraciones mayores del fungicida Benlate®, por ejemplo los peces espada *Xiphophorus helleri* presentan intervalos de confianza menores (Fig. 19) en la concentración de 250 mg/L, que los peces sometidos a 125 mg/L. Este dato muestra que cualquier variación intraespecífica presente no basta para que ciertos peces sobrevivan a expensas del resto. En este sentido, se ha argumentado frecuentemente que el principal efecto de los contaminantes sobre la poza génica de las especies, es que los más débiles son los que más fácilmente son eliminados. Sin embargo, si la intoxicación es grave, cualquier diferencia genética presentada entre los individuos será insuficiente para que los organismos con cualquier genotipo sobrevivan. En cambio en las intoxicaciones leves, estas variaciones sí pueden favorecer a ciertos genotipos sobre otros (Forbes 1998). Aunque en este trabajo no se llevaron a cabo análisis de alozimas en ninguna de las dos especies, se sabe que la constitución genética se correlaciona con la respuesta ante un tóxico. Por ejemplo Newman *et al* (1989) lograron correlacionar la respuesta tóxica de *Gambusia affinis* ante el arsenato con 8 loci enzimáticos; Chagnon *et al* (1989) encontraron la misma correlación para tres loci enzimáticos en *Gambusia* sometido a diferentes concentraciones de cadmio.

El contraste del experimento 1 con el pez mosquito *Gambusia affinis* y el experimento llevado a cabo con *Curbicula fluminea*, ambos sometidos a las mismas dosis

(Silva 1997), indican que ambas especies, a pesar de la diferencia taxonómica, ofrecieron una respuesta a Benlate® muy parecida. Así, mientras que en *Gambusia* el último pez sometido al tratamiento mayor (500 mg/L) murió a las 96 horas, en el experimento llevado a cabo por Silva (1997), solamente sobrevivió el 20% de las almejas. En ambos casos la curva de toxicidad para el tratamiento mayor (500 mg/L) es parecida. Sin embargo, para la dosis de 40 mg/L ocurrió algo distinto, ya que el 100% de *Curbicula* murió a las 144 horas, mientras que *Gambusia* presentó solamente un 15% de mortalidad al final del experimento (188 horas). Por otra parte, en la dosis más baja se obtuvo un resultado contrario al anterior, *Gambusia* presentó la mayor mortalidad (45% vs. 0% en *Curbicula*). A pesar de la contrariedad encontrada en los resultados con las dos dosis mencionadas, puede decirse que ambas especies presentaron una respuesta toxicológica parecida, pese a las diferencias taxonómicas que existen entre ambas.

El fungicida Benlate® es considerado el más efectivo de los fungicidas sistémicos, con un tiempo de vida activa de 4-28 horas en solución acuosa. Los fabricantes establecen que es un fungicida seguro para los mamíferos. A ratas se les ha sido suministrado en forma oral en concentraciones >10 gr/kg, no produciendo ningún efecto teratogénico (Rankin *et al.* 1977). En el presente trabajo no fue posible establecer si Benlate® causaba malformaciones congénitas debido a que los experimentos no fueron hechos a largo plazo. Además se observó que las hembras preñadas tendían a parir inmediatamente después de que eran colocadas en la solución que contenía al fungicida. Por otra parte, con las concentraciones utilizadas en el presente trabajo hubiera sido

difícil que los alevines sobreviviesen, por lo menos durante 96 horas necesarias para establecer la CL50. El único trabajo de toxicología que incluye a alevines y al fungicida Benlate® fue el de Pelawski y Knowles (1986), en el que lograron establecer la CL50 a 96 horas en alevines de trucha arcoiris (0.2 gr. de peso) en 2 µg/L, en los alevines del pez gato de canal (0.2 gr. de peso) fue de 6 µg/L, pero los alevines del pez mojarra (0.2 gr. de peso) presentaron una mayor resistencia, ya que fueron sometidos a 1300 µg/L. Estos experimentos se hicieron paralelamente con Carbendazin, y en todos se encontró que Benlate® era mucho más tóxico. En el presente trabajo la solución más baja empleada fue de 1000 µg/L (1 mg/L), y en este, al igual que en otros tratamientos mayores se observó que algunos alevines sobrevivieron durante el primer día, aunque no fue posible hacer evaluaciones posteriores porque los sobrevivientes se perdieron durante el primer recambio de agua, a las 24 horas de iniciado el experimento.

Por otra parte, la producción de daño genotóxico infringido por Benlate® en los peces mosquito y espada, expresado en forma de micronúcleos, fue dependiente de la concentración empleada. Así, en los peces espada Benlate® produjo más micronúcleos en promedio en las mayores concentraciones. Sin embargo, en los peces mosquito no fue posible establecer si ocurría lo mismo que en los peces espada, debido a que las concentraciones con las que se pudo trabajar (4 y 8 mg/L) con esta especie fueron mucho menores, y las pruebas estadísticas no arrojaron diferencias significativas entre los tratamientos; para tratamientos semejantes (1, 2 y 4 mg/L), los peces espada tampoco arrojaron diferencias significativas (Fig. 19). En invertebrados como el camarón *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda), una dosis muy similar a la empleada en el pre-

sente trabajo (10 mg/L), produjo cambios histopatológicos en el hepatopáncreas, el cecum interior, así como un marcado oscurecimiento de la musculatura y necrosis de las células epiteliales. Dosis mucho menores (1 mg/L), resultaron en un marcado aumento en la mortalidad acumulada (90% hacia el día 19). El comportamiento natatorio se redujo hasta el sedentarismo en todos los camarones expuestos (Leightner *et al* 1996). Este resultado es semejante al encontrado en ambas especies de peces utilizadas en el presente trabajo (Fig. 1). Sin embargo, una diferencia destacada entre ambos trabajos es el tiempo de exposición al tóxico, el cual fue mucho mayor para el trabajo reportado por Leightner *et al* (1996). Aunque en este trabajo no se llevaron a cabo análisis histopatológicos, se observó que las bránquias sufrieron una marcada pérdida de color, probablemente asociado con fenómenos de inflamación que dificultaron la adecuada irrigación de las laminas branquiales; de ser cierta esta hipótesis, probablemente la muerte pudo ocurrir por anoxia; este dato explicaría la marcada disminución en el movimiento motriz registrado en los peces sometidos a Benlate®, en contraste con los peces control.

El biomonitoreo y los citotóxicos

Las principales ventajas que ofrecen los organismos para conocer el efecto tóxicos de las sustancias, y que no pueden ser conocidas por el análisis químico simple, es que los organismos ofrecen una respuesta ante un grupo de factores estresante que actúan en conjunto; esto no podría ser conocido, aún cuando se dispusiera de un amplio listado de parámetros fisicoquímicos tomados *in situ*. El segundo punto es que el medio ofrece una variación espacial y temporal en la calidad del medio, y los organismos son sensibles a éstos cambios (Cairns y Dickson 1980). En este sentido, los peces cumplen una importante función en el manejo de los ecosistemas acuáticos, ya que ofrecen una respuesta rápida. Además, son útiles para conocer los efectos de las descargas de tóxicos, los efectos de bioacumulación, efectos que tienen estas sustancias en las comunidades y si éstos efectos afectan la integridad del ecosistema en conjunto (Cairns y Dickson 1980). Sin embargo, los estudios con peces son difíciles de ejecutarse, básicamente por la naturaleza móvil de los peces; entonces surgen las opciones de investigación, como los estudios de toxicidad en laboratorio. Pero, ¿es la respuesta similar? y ¿en que grado? En la mayoría de los casos, resulta razonable asumir que los peces de laboratorio se comportan de forma semejante al de los peces en los ecosistemas naturales. Sin embargo, factores como la selección de la especie, y la dilución utilizada influye en la respuesta tóxica. Otros factores como la nutrición, la aclimatación, la selección genética, influyen en la precisión de las estimaciones (Chapman 1983).

En los estudios de genotoxicidad, la utilización de peces es muy importante, son muchos los biomarcadores de los que se dispone para esta clase de estudios, entre ellos

esta la prueba de micronúcleos (MN). Los biomarcadores son un reflejo de alteraciones celulares que ocurren en el tiempo, que son capaces de conducir a la enfermedad en algunos casos (Decaprio 1997). En estudios llevado acabo en laboratorio e *in situ* la prueba ha mostrado ser muy sensible. En un estudio realizado con la trucha *Oncorhynchus mykiss* la frecuencia de MN fue similar en los peces expuestos *in situ*, y los estudiados en laboratorio durante 7, 15 y 30 días; la mayor frecuencia de MN y rompimientos cromosómicos la encontraron después de una semana de exposición (De Flora *et al* 1993).

Pruebas de genotoxicidad (micronúcleos)

La presencia de una mayor frecuencia de micronúcleos (MN) ha sido correlacionada en múltiples estudios con la concentración de los tóxicos. En un estudio realizado con peces encontrados en aguas contaminadas que ocurren en las costas Californianas, Hose *et al* (1987), encontraron que la frecuencia de MN fue cuatro veces mayor en las zonas contaminadas, respecto a las áreas control. Cabe mencionar que en este estudio los peces permanecieron en el laboratorio durante 2-3 semanas, antes de extraerles sangre para su estudio. En el presente trabajo, el análisis microscópico de las laminillas hechas con la sangre de los peces mosquito *Gambusia affinis* del experimento 5, no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control para la producción de MN, cabe mencionar que los experimentos tuvieron menor duración que los resalizados por Hose *et al* (1987). En este trabajo los controles presentaron una frecuencia de 2 o/oo, y menos aún fue la figura para los dos tratamientos con Benlate®, aproxi-

madamente un 0.6 - 0.7 o/oo. Sin embargo el error estándar de ambos tratamientos fue semejante, mientras que el de los controles fue mucho mayor, lo que refleja probablemente una respuesta más homogénea entre los tratamientos, y ligeramente más heterogénea para los controles. Así mismo, los intervalos de confianza (al 95%) para ambos tratamientos fueron muy semejantes, mientras que el de los controles fue mucho mayor, lo que revela una respuesta diferencial entre los peces controles, reflejando diferencias de carácter intraespecíficas en la producción basal de MN entre los peces sin tratamiento.

Por otra parte, la bibliografía referente a la duración de la hematopoyesis en peces no es basta, a lo sumo mencionan que el fenómeno es semejante a la presentada por los mamíferos. Sin embargo, la única referencia específica encontrada al respecto (Ellis 1976) menciona que en los salmones la producción de eritrocitos puede durar de 2 a 20 días, dependiendo de las condiciones ambientales. No se encontró información respecto al tiempo de generación de los eritrocitos de los peces mosquito *Gambusia affinis* y de los peces espada *Xiphophorus helleri*.

Los resultados negativos obtenidos con *Gambusia* sometidos a dos concentraciones de Benlate® (ver experimento 5) probablemente se debió a dos cosas: 1) que las concentraciones utilizadas no son capaces de formar MN en eritrocitos, o 2) que el tiempo que los peces permanecieron bajo tratamiento fue insuficiente para completar la hematopoyesis de los peces que estuvieron en presencia de Benlate®. Otra evidencia de la importancia del tiempo en esta clase de estudios, es el estudio llevado a cabo para evaluar el agua para beber con el mejillón *Anodonta cygnea*, reveló que la especie of-

recia la mayor producción de MN a partir del día 13 de exposición a distintas concentraciones; el experimento duró hasta los 28 días (Scarpeto *et al* 1990).

A diferencia de los peces *Gambusia*, con el pez espada *Xiphophorus helleri* si fue posible experimentar con seis diferentes concentraciones subletales de Benlate®. Se decidió trabajar con estas concentraciones porque en el experimento de toxicidad llevado a cabo con anterioridad con espada *Xiphophorus helleri* (experimento 6), no se registró ninguna muerte en la concentración de 32 mg/L. Por ello se decidió experimentar con seis dosis diferentes de Benlate® que decrecían geométricamente a partir de esta cantidad: 0, 1, 2, 4, 8, 16, y 32 mg/L.

El análisis microscópico de los eritrocitos de los peces de los distintos tratamientos (experimento 7) muestra una clara tendencia al aumento en la cantidad de MN a mayor concentración del fungicida Benlate®, siendo únicamente la concentración de 16 mg/L, la que no presentó esta tendencia. A pesar de lo anterior, el análisis de regresión de los valores medios de cada tratamiento, confirmó que a mayor concentración el número medio de MN aumenta (Fig. 23).

A pesar de que el análisis gráfico muestra una clara tendencia al aumento de MN, el análisis de los intervalos de confianza (Fig. 22), demuestra que los peces sometidos a las mayores concentraciones, fueron aquellos que ofrecieron mayor variación en la respuesta ante el fungicida. Este dato es sumamente interesante, ya que indica que las diferencias en los niveles de respuesta registrada no es homogénea, presentándose diferencias de carácter intraespecífico. Por ejemplo, el análisis de los intervalos de confianza

para el control y de los peces sometidos a la concentración menor (1 mg/L), no revelan diferencias en ambos, siendo además los intervalos más pequeños para todos los tratamientos; lo mismo sucede con los intervalos de los siguientes cuatro tratamientos (2, 4, 8 y 16 mg/L), los cuales fueron muy parecidos. Sin embargo, los peces sometidos a la dosis mayor presentan el intervalo de confianza más grande para todos los tratamientos, lo que revela aún una mayor heterogeneidad en la respuesta individual a la producción de MN.

Por otra parte, el análisis de varianza efectuado con la prueba de Kruskal-Wallis, reveló que sí había diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos. Una vez establecida la diferencia, se aplicó la prueba de Dunn para detectar específicamente que tratamientos diferían entre sí. La prueba de Dunn reveló alta significancia para algunos contrastes, sobre todo en aquellos en los que se presentaba una mayor diferencia en la concentración de Benlate® utilizada (TABLA X).

El significado de la muerte celular, en forma de necrosis o apoptosis es mayúscula. Ambos mecanismos son la respuesta que ofrecen las células ante los estresantes, para eliminar a las células afectadas o enfermas; ambos son un mecanismo natural y necesario para la homeostasis celular. Sin embargo, los dos procesos tienen semejanzas y diferencias. Ambas se asemejan en que terminan con la vida de la célula, pero mientras que la necrosis es un mecanismo de respuesta fisiológica inmediata, la apoptosis es una muerte programada genéticamente. De acuerdo a los criterios establecidos por Alberts *et al* (1995), la necrosis aparece ante el microscopio óptico como una célula descom-

puesta, y amorfa, con múltiples roturas al azar en la cromatina, así como una descomposición de la membrana. No se encontraron células apoptóticas bajo los criterios establecidos por Alberts *et al* (1995), Reyes *et al* (1998).

La frecuencia de necrosis pareció aumentar en los tratamientos con Benlate® en los peces mosquito, sin embargo, el análisis de varianza no paramétrico no mostró que hubiera diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control; en los peces espada se encontró lo mismo.

CONCLUSIONES

Biomonitoreo

1. Los resultados obtenidos con ambas especies demostraron su utilidad para estudios de biomonitoreo de pesticidas.
2. Ambas especies fueron fáciles de manejar durante la experimentación.
3. Los peces mostraron diferencias de carácter interespecíficos en los niveles de sobrevivencia alcanzados cuando estuvieron en presencia de Benlate®.

Manejo de los peces

1. Ambas especies son relativamente fáciles de capturar y transportar.
2. Ninguna de las dos especies experimentó mortalidad masiva o enfermedad evidente cuando permanecieron en los acuarios reservorios.

Toxicología

1. Las hembras de ambas especies parieron a los pocos minutos de entrar en contacto con la solución de Benlate®.

2. Los peces de ambas especies tendieron a presentar un comportamiento gregario en presencia de Benlate®.
3. En los machos expuestos a Benlate® descendió marcadamente el comportamiento agresivo y territorial.
4. En ambas especies se observó un marcado descenso en el comportamiento motriz en casi todas las concentraciones de Benlate® utilizadas.
5. Algunos alevines recién nacidos lograron sobrevivir, por lo menos durante 24 horas, en los tratamientos con las menores concentraciones de Benlate®, pero murieron rápidamente en las concentraciones mayores.
6. Los peces de ambas especies expuestos a las dosis menores (≤ 4 mg/L) presentaron niveles de sobrevivencia semejante a los controles, por lo menos en el tiempo en que estuvieron expuestos.
7. La CL50 para el pez mosquito *Gambusia affinis* fue de 59.9 mg/L a las 24 horas, mientras que para el pez espada *Xiphophorus helleri* la CL50 fue de 178 mg/L a las 96 horas.
8. En los peces mosquito los acuarios de recuperación no influyeron para disminuir la tasa de mortalidad; en los peces espada *Xiphophorus helleri* si..

Genotoxicidad

1. La prueba de micronúcleos demostró su utilidad en este trabajo al observarse un incremento en la frecuencia media, estadísticamente significativo, en las concentraciones mayores de Benlate®, con respecto a los controles.

2. En las menores concentraciones utilizadas (≤ 6 mg/L), no hubo diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de micronúcleos con respecto a los controles.
3. En ninguna de las concentraciones utilizada, los peces mosquito *Gambusia affinis* presentaron un marcado aumento en la frecuencia de micronúcleos.
4. *Gambusia* y *Xiphophous* presentaron una respuesta parecida en la formación de micronúcleos en las menores concentraciones.
5. En ninguna de las dos especies, la muerte celular (necrosis), aumentó como resultado de la exposición de los peces a Benlate®.

BIBLIOGRAFÍA

- Abel, PD y V Axiak.** 1988. *Ecotoxicology and the Marine Environment*. Ellis HARwood. New York.
- Adams, SM.** 1990. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. *Am. Fisheries Soc. Symp.* 8:1-8.
- Adelman, IR y LL Smith, Jr.** 1972. Toxicity of hydrogen sulfide to goldfish (*Carassius auratus*) as influenced by temperature, oxygen, and bioassay techniques. *J. Fish Res. Bd. Can.* 29(9):1309-1317.
- Agrios, GN.** 1997. *Plant Pathology*. Fourth Edition. Academic Press. San Diego.
- Alaniz, JG.** 1995. Interacción trófica entre dos especies icticas, *Fundulus lima* Vaillant y *Xiphophorus helleri* Heckel, en el Oasis de San Ignacio, Baja California Sur, México. Tesis de Maestría. U.A.B.C. Ensenada, México.
- Alberts, B, D Bray, J Lewin, M Raff, K Roberts y JD Watson.** 1995. *Molecular Biology of the Cell*. Third Edition. Garland. New York.
- Al-Sabti, K y J Hardig.** 1990. Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxicity effects of industrial waste products in the Baltic Sea, Sweden. *Comp. Biochem. Physiol.* 97C(1):179-182.
- Al-Sabti, K y CD Metcalfe.** 1995. Fish micronuclei for assesing genotoxicity in water. *Mutation Research.* 343:121-135.
- Al-Sabti, K.** 1991. *Handbook of Genotoxic Effects and Fish Chromosomes*. J. Stefan Institute. Ljubljana, Yugoslavia.
- Ames, BC, W.E. Durston, E. Yamasaki, and F.DLee.** 1973. Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70(8):2281-2285.
- Axelrod, HR y LP Schultz.** 1978. *Handbook of Tropical Aquarium Fishes*. T.F.H. Publication, Inc. Neptune City, New Jersey.

- Axelrod**, HR y W Vordewinkler. 1978. *Encyclopedia of Tropical Fishes*. T.F.H. Pub. Inc., New Jersey.
- Axelrod**, HR, WE Burgess, CW Emmens, N Pronek, JG Walls y R Hunziker. 1987. *Dr. Axelrod's Mini Atlas of Freshwater Aquarium Fishes*. Mini-Edition. T.F.H. Publication, Inc. Neptune City, New Jersey.
- Balwin**, IG y KJM Kramer. 1994. Sherman biological early warning systems (BEWS). En Kramer, KJM (Ed.). *Biological of Coastal Waters and Estuaries*. CRC Pres. Boca Ratón.
- Basten**, PJ den. 1998. Concepts for the implementation of biomarkers in environmental Monitoring. *Mar. Poll. Bull.* 46(1):1-5.
- Baudo**, R, D Rossi y Ph Quevauviller. 1995. Validation of the use of aquatic bioindicators by means of reference material. En Mucawar, M, O Hänninen, S Roy, N Munawar, L Karenlampi, D Brown. *Bioindicators of Environmental Health*. Ecovision Word Monograph Series. SPB Academic Publication. U.S.A
- Benomy Health and Safety Guide**. 1993. *Health and Safety Guide No. 81*. Word Health Organization. Geneva.
- Blaxhall**, P.C. 1983. Chromosome karyotyping of fish using conventional and G-banding methods. *J. fish Biol.* 22:417-424 (C).
- Blaxhall**, P.C. 1983. Factors affecting lymphocyte culture for chromosome studies. *J. Fish Biol.* 22:61-76. (A)
- Blaxhall**, PC. 1983. Lymphocyte culture for chromosome preparation. *J. Fish Biol.* 22:279-282. (B).
- Bliss**, CI. 1957. Some principles of bioassay. *Am. Sci.* 45(5): 449-466.
- Bojorquez**, GR. 1994. Efectos genotóxicos de azinfos metílico y oxidemeton metílico: insecticidas de amplio uso en Baja California. Tesis de Maestría. U.A.B.C. México.
- Bradley**, BP. 1990. Stress proteins: Their detection and uses in biomonitoring. En Landis, WG y WH van der Schalie, Eds. *Aquatic Toxicology and Risk Assessment: Thirteenth Volume, ASTM STP 1096*. Am. Soc. for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 338-347.
- Cabrera**, S. 1997. Aspectos ecológicos de la ictiofauna de la Bocana del Arroyo La Misión, Baja California, México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. México.

- Cairns, J Jr. y KL Dickson. 1980. The ABC of biological monitoring. En Hocutt, CH y JR Stauffer, Jr. (Ed.). *Biological Monitoring el Fish*. Lexington Books. Toronto.
- Cairns, J. Jr. 1986. The myth of the most sensitive species. *BioScience*. 36(10):670-672.
- Carey, FA. 1999. *Química Orgánica*. McGraw-Hill. Madrid.
- Chagnon, N. L., C. Guttman y S.I. Guttman. 1989. Differential survivorship of allozyme genotypes in mosquitofish populations exposed to copper or cadmium. *Env. Tox. Chem.* 8:319-326.
- Chapman, GC. 1983. "Do the Test organism in laboratory test respond like organism in natura?" En Bishop, WE, RD Cardwell, y BB Heidolph, (Eds.). *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Six Symposium, ASTM STP 802*. Am. Soc. for Testing and Materials, Philadelphia.
- Chávez, LR. 1992. Genotoxicidad en células epiteliales del tubo digestivo de *Mytilus californiensis* (Conrad 1837) de la Bahía de Todos Santos. Tesis de Licenciatura. U.A.B.C.. Ensenada, México.
- Cortinas de Nava, C, J Espinosa, S Vega, P Ostrosky e I. Jiménez. 1984. Genotoxicidad de farmacos. En: Contreras, CM, Cortinas de Nava, C y LA Barragan. (Eds.) *Avances en el mecanismo de acción de fármacos*:. Masson. México.
- Courtney, A y JA Couch. 1984. Usefulness of *Cyprinodon variegatus* and *Fundulus grandis* in carcinogenety testing: Advantages and special problems. *Nat. Can. Inst. Monography* 65:83-96.
- Crompton, TR. 1997. *Toxicants in the Aqueous Ecosystem*. John Wiley.Chichester. 292 pp.
- Curtis, LA y JL Kinley. 1998. Imposex in *Ilyanassa obsoleta* still common in a Delaware estuary. *Mar. Poll. Bull.* 36(1):97-101.
- De Flora, S, L. Viganó, F D'Ángosti, A Camoirano, m Bagnasco, C Bennicelli, F Melodia y A Arillo. 1993. Múltiple genotoxicity biomarkets in fish exposed *in situ* to polluted river water. *Mut. Res.* 319:167-177.
- Deacon, JW. 1984. *Introduction to Modern Mycology*. Blackwell. Oxford.
- Decaprio, A.P. 1997. Biomarkers: Coming of age for environmental health and risk assessment. *Env. Sci. Tech.* 31(7):1837-1848.

- Denizeau, F y M Marion.** 1984. Cultured rainbow trout and human cells exposed to PCBs in the evaluation of cytotoxicity of aquatic pollutants. *Water Research* 18(2):247-251.
- Dougherty, J.** 1998. *Assessment of Chemical Exposures*. Lewis Pub. Boca Ratón, Flo.
- Eblen, RA y WR Eblen.** 1994. *Encyclopedia of the Environment. The Rene Dubos Center for Human Environment*. Houghton Mifflin. Boston.
- Ellis, AE, RJ Roberts y P Tytler.** 1989. The anatomy and physiology of teleost. En R Balliere (Ed.) *Fish Pathology*. Second Edition. Tindall. London.
- Ellis, AE.** 1976. Leucocytes and related cell in the plaice *Pleuronectes platessa*. *J. Fish Biol.* 8:143-156.
- Finney, DJ.** 1952. *Probit Analysis. A statistical treatment of the sigmoid response curve*. Second Edition. Cambridge Univ. Press. Great Britain.
- Forbes, VE.** 1998. *Genetics and Ecotoxicology*. Taylor & Francis. Ann Arbor, MI.
- Friedberg, EC, GC Walker y W Siede.** 1994. *DNA Repair and Mutagenesis*. Am. Soc. for Microbiology; Washington, DC.
- Gelber, RD, PT Lavin, CR Metha, y DA Schoenfeld.** 1985. Statistical Analysis. En Rand, GM y SR Petrocelli (Eds.). *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Methods and Applications*. Hemisphere. U.S.A.
- Glantz, SA.** 1992. *Primer of Biostatistics*. Third Edition. McGraw-Hill. New York.
- Goldstein, A.** 1962. *Biostatistics. An Intorductory Text*. MacMillan Co. New York.
- Hill, GE.** 1995. Ornamental traits as indicator of environmental health. *Bioscience* 45(1):25-31.
- Hose, P.V. et al.** 1984. Measurement of median lethal dose as a rapid indicator of contamination toxicity to fish. *Env. Tox. Chem.* 3:243-254.
- Klekowski, E Jr., JE Corredor, JM Morell y CA del Castillo.** 1994. Petroleum pollution and mutation in mangroves. *Mar. Poll. Bull.* 28(3):166-169.
- Klumpp, DW y H von Westernhagen.** 1995. Biological effects of pollutants in Australian tropical coastal waters: Embryonic malformations and chromosomal aberrations in developing fish eggs. *Mar. Poll. Bull.* 30(2):158-165.
- Kotelevtsev, SV.** (1994). Biomonitoring of genotoxicity in coastal waters. En Kramer y KJ (Ed). *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. CRC Press. Boca Ratón.

- Legge, R.** 1970. *The Complete Aquarist's Guide to FRESHWATER TROPICAL FISHES*. Golden Press. New York.
- Lower, WR y RJ Kendall.** 1990. Sentinel species and sentinel bioassays. En J.F. McCarthy y L.R. Shugart (Eds.). *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewin Pub., Boca Raton, Flo.
- Malling, HV.** 1972. Monitoring of chemical mutagens in our environment. En Sutton, HE y MI Harris (Eds.). *Mutagenic Effects of Environmental Contaminants*. Academic Press. New York.
- Markert, B, J Oehlmann, y M. Roth.** 1997. General aspects of heavy metal monitoring by plants and animals. En Subramanian, KS y CV Iyengar (Eds.). *Environmental Biomonitoring. Exposure Assessment and Species Banking*. Am. Chem. Soc. Washington, D.C.
- Marshall, E.** 1993. Toxicology goes molecular. *Science*. Vol. 259:1394-1398.
- Mead, R y RN Curnow.** 1983. *Statistical Methods in Agriculture and Experimental Biology*. Chapman and Hall. London.
- Morrison y, RT y RN Boyd.** 1997. *Organic Chemistry*. Fifth Edition. Allyn and Bacon, Inc. Boston.
- Murty, AS.** 1986. *Toxicity of Pesticides to Fish Vol. I*. CRC Press. Boca Ratón, Flo.
- Newman, MC y SU Mitz.** 1989. Size dependence of zinc elimination and uptake from water by mosquitofish *Gambusia affinis* (Baird and Girard). *Aq. Tox.* 12: 17-32.
- Newman, MC.** 1995. *Quantitative Methods in Aquatic Ecotoxicology*. Lewin Pub. Boca Ratón, Flo.
- Newman, NC.** 1998. *Fundamentals of Ecotoxicology*. Ann Arbor Press. U.S.A.
- Nicholson, B.L.** 1972. Fish cell cultures: An overview. In Kuroda, Y., E. Kurstak and M. Maramorosh. Eds. *Invertebrate and fish tissue culture*. Japan Scientific Press. Springer-Verlag. Berlin.
- Nicholson, BL.** 1972. Fish cell cultures: An overview. En Kuroda, Y, E Kurstak y M Maramorosh. (Eds.). *Invertebrate and Fish Tissue Culture*. Japan Scientific Press. Springer-Verlag. Berlin.
- Palawski, DU y CO Knowles.** 1986. Toxicological studies of benomyl and carbendazin in rainbow trout, channel catfish and bluegill. *Environmental Toxicology* --: 1039-1046.

- Pimentel**, D. 1971. Evolutionary and environmental impact of pesticides. *Bioscience* 21(3):109.
- Powers**, DS. 1989. Fish as a model systems. *Science*, 246:352-346.
- Presscott**, DM y AS Flexer. 1982. *Cancer. The Misguided Cell*. Scribners. New York.
- Rand**, GM y SR Petrocelli. 1985. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere. U.S.A.
- Rankin**, MG y DG Dixon. 1994. Acute and chronic toxicity of waterborne arsenite to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51:372-380.
- Rankin**, P.W., J.G. Surak, y N.P. Thompson. 1977. Effect of benomyl and benomyl hidrolisis products on *Tetrahymena pyriformis*. *Cosmet Toxicol.* 15:187-193.
- Rauchenberger**, M. 1989. Systematics and biogeography of the Genus *Gambusia* (Cyprinodontiformes:Poeciliidae). American Museum of Natural History. New York.
- Restrepo**, I. 1992. *Los Plaguicidas en México*. Comisión Nacional de Derechos Humanos.
- Reyes**, AF y MEO Chavarría. 1998. La apoptosis como proceso esencial de regulación en la gónada masculina. En Velázquez, JM (Ed.) *Biología de la Reproducción*. UAM-1. México.
- Root**, M. 1990. Biological monitors of pollution. *BioScience*. 40(2):83-86.
- Ruiz-Campos**, G, JL Castro-Aguirre, S Contreras-Balderas, ML Lozano-Vilano, AF González-Acosta, y S Sánchez-González. (En prensa). An anotated distribution cheklist of the freshwater fishes from Baja California Sur, Mexico. *Rev. Fish Biol. And Fisheries*.
- Schmid**, W. 1975. The micronuclei test. *Mutation Research* 31:9-15.
- Schmid**, W. 1976. The micronucleus test for cytogenetic analysis. En Hollaender, A. *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection Vol. 4*. Plenum Press. New York-London.
- Sherman**, H, R Culik, y RA Jackson. 1975. Reproduction, teratogenic, and mutagenic studies with benomyl. *Toxicology and Applied Pharmacology* 32, 305-315.
- Silva**, HK. 1997. La almeja *Corbicula fluminea* (Muller, 1774) como organismo experimental en toxicología de ambientes dulceacuícolas. Tesis de Maestría. U.A.B.C. Ensenada. México.

- Solbé, JF de LG** 1979. Studies on the effects of pollution on freshwater fish. En Ravera, O. (Ed.). *Biological Aspects of Freshwater Pollution*. Pub. for the Commission of the European Communities by Pergamon Press. New York.
- Sprage, JB** 1969. Measurement of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay Methods for Acute Toxicity. *Water Research* 3:793-821.
- Sprage, JB.** 1990. Aquatic toxicology. En Schreck CB y PB Moyle. (Eds.) *Methods for Fish Biology*. Am. Fish. Soc. Bethesda, Maryland.
- Styles, JA y R Garner.** 1974. Benzimidazolecarbamate methyl ester -evaluation of its effects *in vivo* and *in vitro*. *Mutation Research* 26:177-187.
- United States Departmente of the Interior Fish and Wildlife Serive.** (S.F.) *Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates*. Resouce Publication #137.
- Weis, W.** 1985. *Aquarium Keeping Easy....as ABC*. T.F.H. Neptune City. N.J.
- Wolfe, JR y A Perlmutter.** 1969. Fish cells in cuture for study of aquatic toxicants. *Water Research*. 2:409-414.
- Younos, TM y DL Weigmann.** 1988. Pesticides: a continuin dilemma. *Journal WPCF* 60(7):1199-1205.
- Zar, JH.** 1996. *Biostatistical Analysis*. Third Ed. Prentice-Hall. U.S.A.
- Zimmerer, EJ.** 1984. Usefulness of the Guppy, *Poecilia reticulata*, in Carcinogenicity Testing: Special Adventages and Problems. *National Center Institute Monograph* 65, May.

APÉNDICE

EL PEZ MOSQUITO *Gambusia affinis affinis* (Baird y Girard)

Nombre y distribución

El nombre científico de *Gambusia affinis* deriva del español *Gambusino*, sin nada de valor", y del latín *affinis*, relacionado. El nombre común, pez mosquito, se le dio por incluir en su dieta larvas de moscos (Axelrod y Schultz 1978). *Gambusia affinis* es originario del centro de los Estados Unidos. Actualmente se distribuye desde Texas y Alabama (Axelrod y Schultz 1978) hasta Centro América (Rauchenberger 1989).

Descripción Taxonómica

Gambusia affinis fue descrito por primera vez por Baird y Girard en 1854. El pez es miembro de la Familia *Poeciliidae*, carpas dentadas que dan a luz crías vivas. Se caracteriza por los siguientes conteos: dorsal 7-9; anal 9; pectoral 13-14; pélvicas 6; escamas 30-32 (Axelrod y Schultz 1978).

Características morfológicas

El cuerpo de los peces mosquito puede ir desde color olivo con café en la parte superior a plateado con cabeza y espalda oscura, lo cubren grandes escamas con pigmentos oscuros en las aletas; ocasionalmente presentan una raya oscura debajo de los ojos. La mandíbula inferior esta proyectada hacia delante; poseen dientes pequeños (Axelrod *et al* 1987). A diferencia de otros peces, no presenta ninguna línea lateral verdadera, en su lugar aparece una línea formada por unas treinta escamas. Vista en perspectiva, la aleta dorsal de forma lobularda, esta localizada detrás del ano.

Reproducción

Los peces mosquito presentan fertilización interna. Los machos, utilizando el gonopodio, transfieren los paquetes de espermatozoides a las hembras, y estas podrán hacer uso de éstos en el momento o para fertilizaciones futuras, fenómeno que tendrá lugar 3 ó 4 veces a lo largo de su vida. Es característico que las hembras preñadas presenten una vientre abultado y oscurecido. La prole consta, en promedio de 40 a 100 individuos, dependiendo del tamaño de la hembra; las hembras más grandes pueden procrear hasta 300 jóvenes a la vez. Los nacimientos pueden repetirse cada 3 ó 4 semanas (Axelrod y Vorderwinkler 1978). Al igual que el resto de la familia *Poeciliidae*, los peces mosquito presentan un decremento en los niveles de fecundidad conforme transcurre el ciclo de vida. Los recién nacidos miden entre 8-9 mm de largo y son capaces de evitar a los depredadores, entre los que se incluyen sus propios padres. Los jóvenes nacen con una pequeña hilera de dientes puntiagudos, rayas totalmente

desarrolladas y una pequeña vejiga natatoria debajo de las aletas pectorales.

Los juvenes se alimentan de plancton, diatomeas y algas. El patrón de crecimiento de los peces mosquito depende del sexo, en los machos se detiene cuando los juvenes alcanzan su madurez sexual, alcanzando una talla de unos 2.5-3.2 cm de longitud; las hembras crecen durante toda su vida llegando a alcanzar entre 5.2 y 6.2 cm de largo. La expectativa de vida para ambos sexos se sitúa entre los 6-15 meses.

Ecología

Los peces mosquito son extremadamente agresivos con otros peces, aunque los depredan los picívoros más grandes que ellos, así como gatos, culebras, mapaches, sarigüellas y garzas (Axelrod y Vorderwinkler 1978). Habitan usualmente lagos, ríos, crecientes, arroyos, vasos; preferentemente buscan las aguas menos profundas en donde la vegetación es más densa. Presentan alta resistencia a las fluctuaciones ambientales, como cambios de salinidad, concentración de oxígeno disuelto y temperatura (4.5-45 °C); aunque el óptimo de esta última se localiza entre los 15 y 30 °C. En su dieta están incluidas las larvas de moscos, huevos de otros peces; incluso atacan a otros peces como los bagres y las carpas. También es capaz de producir desequilibrios ecológicos, como los *blooms* de microalgas, debido a que se alimentan del zooplancton que las depreda. Incluso su fama de consumir grandes cantidades de larvas de moscos (su propio peso al día), se ve opacado por el hecho de que contribuye a la formación de plagas de moscos ya que depreda fuertemente los invertebrados que incluyen también a las larvas de moscos en su dieta (Axelrod y Burgess 1987).

Usos

Los peces mosquitos han sido introducidos en muchas partes del mundo como control biológico de moscos, en especial en aquellas regiones en donde existe el paludismo. Pero, por desgracia estas introducciones han propiciado la extinción de especies locales, incluyendo a aquellas que en un momento dado pudieran ser mejores controles biológicos que ellos. Otro problema es que afecta a aquellas poblaciones de peces que están en peligro de extinción, como *Crenycthyis baileyi*, nativo de Nevada. Hay lugares, como California, que han restringido las introducciones de peces mosquitos debido a que son capaces de migrar a regiones habitadas por peces en peligro de extinción. Un uso menos ortodoxo de los peces mosquito lo constituye su utilización en pruebas de toxicidad y en el biomonitoreo de contaminantes. En general, son de fácil mantenimiento y propagación en acuarios, sin embargo no se recomienda mezclarlos con otros peces. También se les utilizador como alimento vivo (Axelrod *et al* 1987).



Fig. 29. Peces mosquito *Gambusia affinis*. Observe la presencia del gonopodio en los machos, y el menor tamaño que presentan (Foto tomada de Axelrod *et al* 1987).

Pez espada *Xiphophorus helleri*

El pez espada *Xiphophorus helleri* pertenece a la familia de los Poeciliidae (carpas dentadas que dan a luz crías vivas). Fue nombrado científicamente por Heckel en 1848. Localidad tipo: Río Chixoy, Guatemala. Rango: desde el sur de México hasta Guatemala. El nombre común derivó de la apariencia que tiene la aleta anal, y no por la apariencia de la aleta caudal que es más conspicua. Es uno de los peces vivíparos con mayor aceptación para acuario debido a que pueden vivir bien en la comunidad (Axelrod y Schultz 1978). Los peces espada originales encontrados en México son de color verde olivo, y la cola tiende a ser más corta que la de los peces de acuario. Es un pez que gusta de saltar ocasionalmente y es fácil de localizar en las partes más rápidas que poseen plantas en los alrededores para esconderse. Los machos alcanzan hasta 12.5 cm y las hembras un poco menos (Legge 1970).

Existen diversas variedades de peces espada, por su nombre en inglés se clasifican en: *green swortail*, *green wagtail swortail* y el *red swortail*; el pez que se utilizó para este trabajo de tesis se denomina *green swortail*, caracterizado por la presencia de líneas de color rojo y amarillo situados a los lados de la línea lateral. La hembra carece de la extensión de la aleta caudal característica de los machos, así como de las manchas de color negro que recorren todo lo largo de la aleta caudal de los machos (Axelrod y Schultz 1978; Alaniz 1995). Otra característica que permite diferenciar a los machos de las hembras es la presencia del gonopodio que únicamente presentan los primeros en la parte inferior; se trata de una aleta modificada para transferir los paquetes de esperma.

Conteo: Dorsal 11-14; anal 8-10; pectoral 12-13; pélvicas 6; escamas 26-30 (Axelrod y Schultz 1978). Los peces espada viven mejor en aguas ligeramente alcalinas, la temperatura óptima es de 25 °C (Axelrod 1987). Comen abundantemente, cualquier clase de alimento; incluso se han observado individuos tratando de consumir presas demasiado grandes.

Los machos son muy propensos a la reproducción. La hembra puede llegar a tener hasta 200 hijos a la vez, aunque el número rápidamente disminuye debido al canibalismo practicado por los padres. Los pequeños crecen rápidamente y requieren de mucho espacio para nadar. Se han registrado casos de cambio "espontáneo" de sexo (Legge 1970).



Fig. 30. Peces espada *Xiphophorus helleri*. Observe el marcado dimorfismo sexual caracterizado por la presencia de la cola en forma de espada de los machos. Foto tomada de Weis (1985).