



Toxicidad letal y subletal del fosfato de sodio dibásico y efectos en branquias y conducta de las crías del pez goodeido *Skiffia multipunctata*

Lethal and sublethal toxicity of sodium phosphate dibasic and effects in gills and behaviour of fry on the goodeid fish *Skiffia multipunctata*

Rueda-Jasso Rebeca Aneli,¹ De los Santos-Bailón Alejandra,¹ Fuentes-Farias Ana Lilia² y Gutierrez-Ospina Gabriel³

¹Laboratorio de Biología Acuática, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edif Biología Acuática, Ciudad Universitaria, Ave. Francisco. J. Múgica s/n Col. Felicitas del Río, Morelia, 58040. Michoacán

²Laboratorio de Ecofisiología Animal, Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. San Juanito Itzicuaró s/n Col. Nueva Esperanza, Morelia, 58337. Michoacán

³Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Sede del Tercer Circuito Exterior, Edificio "B", 2º Piso Ciudad Universitaria, México, D.F., 04510. México
e-mail: rebeca.rueda@gmail.com

Rueda-Jasso R. A., A. de los Santos-Bailón, A. L. Fuentes-Arias y G. Gutiérrez-Ospina. 2014. Toxicidad letal y subletal del fosfato de sodio dibásico y efectos en branquias y conducta de las crías del pez goodeido *Skiffia multipunctata*. *Hidrobiológica* 24 (3): 207-214.

RESUMEN

El fosfato orgánico es un compuesto esencial que interviene en diversos procesos metabólicos, además forma parte de biomoléculas de gran relevancia (proteínas, ADN, ARN, ATP). En los ecosistemas acuáticos es indispensable para el desarrollo de las cadenas tróficas. Sin embargo, los fosfatos derivados de detergentes y fertilizantes son uno de los principales contaminantes de los cuerpos de agua. No obstante, los efectos deletéreos de los fosfatos en la morfología de los organismos acuáticos, particularmente en peces no se han documentado. Por ello, el presente estudio determinó los efectos negativos que el fosfato de sodio causó en la supervivencia, la conducta de nado, la respuesta al alimento y la morfología branquial en crías del pez *Skiffia multipunctata* (Pellegrin, 1901). *Skiffia multipunctata* se le considera en estado de conservación amenazado; se trata de una especie endémica de la cuenca del Bajo Lerma y la parte alta de la cuenca Santiago (en la parte centro occidente de México). Los resultados mostraron que los organismos expuestos al fosfato exhibieron aletargamiento, preferencia a nadar por el fondo del acuario, boqueo, nado en espiral y choques contra las paredes del acuario. Los cortes histológicos de las branquias mostraron lamelas hiperplásicas, picnosis celular y fusión lamelar. Los efectos de estas alteraciones fueron dependientes de la concentración de fosfatos. Las alteraciones a nivel branquial coincidieron con la preferencia de los peces a nadar cerca de la superficie y fondo del acuario y con la disminución del número de peces activos durante la alimentación. Lo anterior hace suponer que el cambio conductual es una evidencia de una falla en la captación de oxígeno en el tejido branquial. Los hallazgos del presente trabajo enfatizan la importancia de investigar el efecto negativo que altas concentraciones de fosfatos pueden ocasionar en especies sensibles y endémicas como *S. multipunctata*.

Palabras clave: Conducta, contaminación acuática, ecofisiología, fosfatos, Goodeidos, *Skiffia multipunctata*.

ABSTRACT

Organic phosphate is an essential compound involved on several metabolic processes, and it is a component of biomolecules of great relevance (proteins, DNA, RNA and ATP). In the aquatic ecosystems, it is necessary for the development of trophic chains. However, phosphates derivated from detergents and fertilizers are some of the main con-

taminants in water bodies. Nevertheless, the deleterious effects of the phosphates on the morphophysiology of aquatic organisms, particularly in fishes, have not been documented. For this reason, the present work determined the negative effects that the sodium phosphate caused on the survival, swimming behavior, response to the presence of food and gill morphology of the fry of *Skiffia multipunctata* (Pellegrin, 1901). This species is endemic to the lower Lerma basin and to the upper Santiago basin (both in the Western central part of Mexico), and it is considered threatened. Results showed that organisms exposed to the phosphate exhibited lethargy, preference towards swimming near the bottom of the aquarium, gasping, spiral swimming and crashing against the walls of the aquarium. Histological preparations of the gills showed lamellar hyperplasia, cell pyknosis and lamellar fusion. The effects of these alterations depended on the phosphates concentration. The gill alterations coincided with the preference of the fish towards swimming near to the surface and bottom of the aquarium and with the decrease in the number of active fish during feeding. This constitutes strong evidence that behavioral changes are related to the failure of the oxygen capture in the gill tissue. These findings emphasize the importance of researching the negative effects that high concentrations of phosphates can cause on sensitive and endemic species such as *S. multipunctata*.

Key words: Aquatic contamination, behavior, ecophysiology, goodeids, phosphates, *Skiffia multipunctata*.

INTRODUCCIÓN

El fosfato orgánico es un compuesto estructural para los organismos vivos, ya que participa en la formación de biomoléculas que entre otras incluyen a los ácidos desoxirribonucleico (DNA) y ribonucleico (RNA). Este compuesto es esencial en la actividad metabólica, particularmente en la generación de energía (ADP-ATP) (Smil, 2000).

En los ecosistemas acuáticos, el fosfato (en concentraciones mínimas) es indispensable para la estimular la productividad primaria (Zhang *et al.*, 2008) y el desarrollo de las cadenas tróficas. Sin embargo, su presencia excesiva favorece la eutroficación y pérdida de biodiversidad (Sondergaard *et al.*, 2007). Este nutriente ingresa a través de los afluentes de aguas residuales, así como de los escurrimientos y lixiviados de fertilizantes (Fontúrbel, 2005; Wind *et al.*, 2007). No obstante, poco se conoce de los efectos negativos directos del fosfato en los organismos acuáticos, aunque es muy conocido el papel que éste ejerce en la eutroficación y los efectos negativos de ella (elevación de la turbidez y pH del agua, disminución de oxígeno disuelto, cambio en la composición de especies, alta probabilidad de mortalidad de peces, entre otros) (Smith *et al.*, 1999).

En México, la cuenca del río Lerma-Chapala figura como la zona más densamente poblada del territorio mexicano (11% de la población nacional) (Wester *et al.*, 2001; Sedeño-Díaz & López-López, 2007) y también es considerada una de las más contaminadas del país (De la Vega-Salazar, 2006; Sedeño-Díaz & López-López, 2007; Domínguez-Domínguez, 2008). Los numerosos asentamientos humanos y las actividades económicas de la zona (agricultura, ganadería e industria de diferentes tipos) sobreexplotan y drenan sus aguas residuales (sin o con escaso tratamiento) en los cuerpos de agua. Lo anterior es de gran importancia ya que esta zona es hábitat de diversas especies entre las que se encuentran peces endémicos como la subfamilia Goodeinae (conformada por 41 especies) (Domínguez & Pérez, 2007); sólo en el sistema hidro-

lógico del río Lerma se encuentran 16 de estas especies. Como consecuencia de la alteración del hábitat, muchas especies de goodeidos han disminuido sus áreas de distribución y algunas otras han desaparecido del hábitat original por largos periodos aunque aún no se les considera extintas (Lyons *et al.*, 1998; De la Vega-Salazar, 2006).

No obstante, los trabajos hasta ahora realizados en goodeidos en los que se documenten los efectos relacionados con la contaminación ambiental son escasos (Tejeda-Vera *et al.*, 2007; Arellano-Aguilar & Macías, 2008, 2009; Ortiz-Ordoñez *et al.*, 2011; López-López *et al.*, 2011).

Por lo anterior el presente estudio planteó determinar los efectos de la exposición letal y aguda de los fosfatos en la supervivencia, conducta de nado y respuesta a la presencia de alimento e histología branquial en crías de *S. multipunctata*. Lo anterior como una primera aproximación al conocimiento del efecto negativo de las concentraciones elevadas de fosfatos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del presente estudio se seleccionó a *Skiffia multipunctata*. Esta especie se distribuye en la zona circundante al lago de Chapala (conocida como región del Bajo Lerma en Jalisco y Michoacán) (Díaz-Pardo *et al.*, 1993) y en la zona alta de la cuenca Santiago (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2005). *S. multipunctata* se seleccionó por ser una especie sensible a cambios en la calidad de agua y por lo tanto se le ha considerado indicadora de calidad ambiental (Huidobro, 2000), además de que actualmente figura como amenazada (NOM-059 ECOL 2010).

Obtención del material biológico. Para la obtención de las crías de *S. multipunctata* se colectaron hembras grávidas en el manantial La Luz (19° 56' 13.27" N y 102° 17' 58.35" O). La colecta se realizó en abril 2011, con ayuda de un chinchorro de 10 m largo, 2 m caída y 0.01 m luz de malla. Las hembras grávidas se seleccio-

naron manualmente y se transportaron al laboratorio en bolsas de plástico con agua del sitio, en hieleras previamente acondicionadas. En el laboratorio, las hembras se aclimataron y se distribuyeron en acuarios de 90 L de capacidad. El agua se mantuvo a 21 °C, con iluminación natural y aireación de fondo. Las hembras se alimentaron dos veces al día con alimento vivo (*Daphnia pulex* y *Lumbriculus variegatus*) y alimento inerte (hojuela Wardley, USA). Los restos de alimento y el sedimento se retiraron diariamente mediante sifoneo. El nacimiento de las crías ocurrió en un lapso de una semana. Los recién nacidos se separaron de las madres y se transfirieron a acuarios (T: 22 ± 1 °C, fotoperiodo: 12 h L / 12 h O, pH: 7 ± 0.5 , O₂: 7 ± 1 mg/L). Cuando las crías alcanzaron 45 días de edad, se midieron en longitud total y peso húmedo (vernier digital Fisher Scientific S/N 1366162, USA y balanza analítica Ohaus Adventurer, precisión 0.0001 g, China). Los organismos con pesos y tallas extremos se descartaron y con los peces restantes se formaron grupos de 10 peces con biomásas similares (0.084 ± 0.0094 g) y longitud total (18.84 ± 1.02 mm).

Las diferentes pruebas se realizaron en acuarios de vidrio (7 L de volumen); estos se llenaron con agua, cuya calidad (temperatura, pH, O₂ disuelto y % saturación de oxígeno) fue monitoreada con una sonda multiparamétrica (YSI Modelo 6820V2, USA) al inicio, cada 24 horas y al final de los periodos de experimentación.

Para la determinación de la concentración letal CL₅₀ y del efecto tóxico subletal, en cada concentración se utilizaron 30 crías (tres acuarios con 10 peces cada uno) e igualmente para el control libre de fosfato de sodio. Los procedimientos utilizados para el manejo, mantenimiento y sacrificio de los peces fueron diseñados de acuerdo a las guías para el manejo de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (1996) y se procuró en todo momento disminuir el sufrimiento de los animales. Los experimentos se realizaron siguiendo los criterios establecidos por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE, 2008) para pruebas de toxicidad.

Determinación de la concentración letal media (CL₅₀). En esta prueba se determina la concentración que causa mortalidad al 50% de la población experimental. Para ello, 24 h antes del inicio del experimento se suspendió la alimentación de los peces y no se les alimentó durante la exposición al tóxico (96 h). En el ensayo, los organismos fueron expuestos a concentraciones crecientes (0.13, 0.32, 0.88, 1.10, 1.41, 2.40 mg/L) de fosfato dibásico de sodio (NaH₂PO₄·H₂O, Baker, pureza 98.56%), además de un grupo control sin fosfatos. Estas concentraciones se eligieron considerando los niveles de fosfatos registrados en la bibliografía en diversos cuerpos de agua de la zona del Bajo Lerma (Ledesma, 2001; Herrera, 2007; Cuevas *et al.*, 2011), así como en función de un intervalo geométrico.

La exposición tuvo una duración de 96 horas y se realizó en un sistema estático. Una vez agregado el tóxico, se registró la

mortalidad a las 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 h. La mortalidad de los organismos se confirmó mediante un suave toque; ante la falta de reacción los organismos se retiraron del acuario inmediatamente. Con base en los datos de mortalidad y a través del análisis Probit propuesto por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA 2008, versión 1.5) se estimó la CL₅₀. Dicha concentración sirvió como criterio para seleccionar las dosis subletales. Durante el periodo de la prueba subletal se realizaron observaciones del comportamiento de los peces evaluando su ubicación en el acuario, el letargo y boqueo acelerado. Esta evaluación midió el porcentaje de organismos que presentaron una determinada conducta.

Determinación del efecto tóxico subletal. En este experimento se evaluó el efecto de dosis menores a las CL₅₀ en periodos de exposición prolongados. Estas se eligieron a partir de las concentraciones probadas para la CL₅₀, una vez que esta se calculó, se seleccionaron las dos concentraciones menores dentro los intervalos probados. Este experimento se realizó en las mismas condiciones que el de CL₅₀, excepto que fue en un sistema semiestático con recambio de agua y reposición del tóxico cada 72 h. Este periodo de tiempo fue el resultado de la aplicación de las concentraciones a los acuarios (con las mismas condiciones experimentales) y sin organismos de prueba; en los cuales cada 12 h se determinó la concentración nominal (metodología NMX-AA-029-SCFI-01), a partir de estos datos se eligió el tiempo de persistencia mínima del 80% del tóxico (72 h).

Los peces fueron divididos en tres grupos (expuestos a las concentraciones 0.88 y a 1.10 mg/L de fosfato de sodio dibásico (NaH₂PO₄·H₂O, Baker, pureza 98.56%) y el grupo control que se mantuvo libre del tóxico (tres repeticiones por tratamiento, con 10 peces por acuario, n = 30). Diariamente los peces se alimentaron dos veces al día con hojuela (Wardley, USA) en una cantidad equivalente al 6% de la biomasa de los peces. Cada 72 h, tres peces de cada tratamiento se extrajeron, se pesaron, midieron y se sacrificaron con una sobre dosificación de anestésico (benzocaina 75 mg/L) e inmediatamente se fijaron por inmersión en Bouin. El periodo de exposición tuvo una duración de 13 días.

Histología branquial. Los estudios histológicos branquiales se llevaron a cabo en cortes coronales (2 µm) que se tiñeron con hematoxilina-eosina y posteriormente se observaron con ayuda de un microscopio compuesto de campo claro (Leica, DM 3000). Las imágenes digitales se realizaron con el mismo equipo de microscopía utilizando la cámara digital (Leica DF310) y el programa Leica Aplicación Suite V3. En la totalidad de las láminas se valoró cualitativamente la presencia o ausencia de infiltrados, angiogenesis y los posibles cambios citológicos

Experimento de conducta. Para este experimento se utilizaron las concentraciones subletales 0.32, 0.88 y el grupo control 0.00 mg/L. Las concentraciones se eligieron con el mismo criterio que para

el efecto subletal. Para el experimento de conducta se decidió disminuir una concentración con respecto a las seleccionadas en el efecto subletal, esto con el fin de determinar si en concentraciones menores a estas se presentaban alteraciones conductuales.

Los tratamientos y el grupo control se mantuvieron en acuarios de 70 x 30 x 20 cm (altura, largo y ancho); cada acuario se dividió en tres partes: superficie, medio y fondo. Para la obtención de datos conductuales se realizaron grabaciones en un circuito cerrado de televisión, dos veces al día (9 y 14 horas). Previo a que se adicionara el alimento a los acuarios se grabaron cinco minutos para observar la presencia de los peces en su distribución en la columna de agua, una vez adicionado el alimento se grabaron 5 minutos y se contabilizó el número de peces activos durante la alimentación. El experimento tuvo una duración de 25 días. El sistema y las características de calidad de agua fueron las mismas que en el experimento subletal.

Análisis de datos. Los datos (peso individual al final del experimento) de la prueba subletal de los peces expuestos al tóxico vs los del grupo control, así como la respuesta de los peces al alimento se compararon mediante análisis de varianza (ANDEVA de una vía) previa comprobación de la homogeneidad de varianza ($p < 0.05$). La conducta de los peces con respecto a su presencia en la columna de agua se evaluó mediante la prueba χ^2 (Sokal & Rohlf, 2000).

RESULTADOS

Los parámetros de calidad de agua que se monitorearon se mantuvieron constantes durante los experimentos: letal, subletal y de conducta (Temp 22.2 ± 0.9 , pH 7.25 ± 0.25 , O_2 disuelto 6.4 ± 0.4 mg/L, porcentaje de saturación de O_2 73.7 ± 4.7). Dado que las concentraciones de fosfatos que se agregaron fueron bajas, los niveles de pH mantuvieron variaciones mínimas.

Concentración letal media (CL_{50}). La CL_{50} obtenida fue de 1.414 (1.058-2.130) mg/L de fosfato de sodio dibásico (Tabla 1). Durante la exposición al tóxico, los peces del grupo control optaron por ubicarse en la parte media del acuario y presentaron un comportamiento normal (nado, respiración). Este mismo comportamiento

fue exhibido por los peces de todas las concentraciones durante las primeras seis horas de exposición. A partir de esta hora las alteraciones de conducta se hicieron presentes en los peces de todas las concentraciones, siendo más evidente en las concentraciones elevadas a un menor tiempo de exposición (Tabla 2). La pérdida del equilibrio solo se observó en las concentraciones más altas (1.41 y 2.4 mg/L de fosfato de sodio dibásico).

Efecto subletal. Los valores (promedio y desviación estándar) de peso y longitud total de los peces expuestos a 0.88 y 1.10 mg/L de fosfatos al final de experimento fueron 0.085 ± 0.023 g; 19.34 ± 1.13 mm y 0.097 ± 0.012 g, 20.04 ± 1.09 mm respectivamente y el grupo control 0.094 ± 0.013 g, 19.52 ± 1.13 mm. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tres grupos. Los peces del grupo control no mostraron alteraciones histológicas en branquias durante la totalidad de la exposición al tóxico (Fig. 1A-B). Los peces expuestos a las concentraciones 0.88 y 1.10 mg/L mostraron severas alteraciones morfológicas en las branquias, que se manifestaron desde el cuarto día de exposición y que fueron más evidentes conforme transcurrió el experimento e incrementó la concentración. Para el día 13 de exposición, 65% de los peces muestreados de la concentración 0.88 mg/L mostraron lamelas primarias y secundarias con sus componentes celulares hiperplásicos e hipertróficos o edematizados; el número de vasos sanguíneos disminuyó, los eritrocitos tendieron a la picnosis y el eje cartilaginoso se redujo (Fig. 1C-D). En la concentración 1.10 mg/L, dichas alteraciones se hicieron evidentes en 80% de los organismos en un lapso menor (día 10), además de que los eritrocitos se evidenciaron completamente picnóticos y el eje cartilaginoso sólo se observó en secciones aisladas (Fig. 1E-G).

Experimento de conducta. En total se registraron 750 minutos de grabaciones, 375 min para ver presencia en la columna de agua y 375 min para el número de peces activos en alimentación. Durante los primeros once días de exposición, el comportamiento de nado y alimentación exhibido por los peces del grupo control así como por los expuestos a los fosfatos fue normal; este comportamiento se mantuvo para los organismos del grupo control durante todo el experimento (25 días de exposición). A partir del día doce, ambas concentraciones de fosfatos provocaron modificaciones en la conducta de los peces. El análisis estadístico mostró que la presencia de los peces en la columna de agua (Fig. 2) fue dependiente de la concentración del fosfatos ($p < 0.05$), manifestándose una dependencia entre la concentración-efecto en las conductas evaluadas. Por su parte, la respuesta de los peces al alimento en el grupo control fue activa durante todo el periodo experimental, mientras que en los expuestos a los fosfatos mostraron un comportamiento activo durante los 18 primeros días de exposición y posteriormente se observó disminución de la actividad. Al día veinte de exposición el número de peces activos al alimento fue significativamente distinto ($p < 0.05$) entre los tratamientos (Fig. 3) y se vieron comparativamente más afectados (menos activos) los organismos expuestos a la concentración 0.88 mg/L.

Tabla 1. CL (96 horas) del fosfato de sodio dibásico en crías de *Skeffia multipunctata*.

Dosis letal	Concentración (mg/L)	Límites de confianza 95%
CL 1	0.053	0.010-0.118
CL 5	0.138	0.044-0.244
CL10	0.231	0.097-0.362
CL15	0.327	0.163-0.477
CL 50	1.414	1.058-2.130

Tabla 2. Porcentaje de peces que manifestaron diferentes conductas a la exposición a seis diferentes concentraciones de fosfato de sodio y 96 horas de exposición.

Tiempo (h)	Concentraciones de fosfato de sodio en mg/L						
	0.00	0.13	0.32	0.88	1.10	1.41	2.4
6	N (100)	N (100)	N (100)	N (100)	N (100)	N (100)	N (50) F (50)
12	N (100)	N (100)	N (100)	N (87) F (13)	N (73.3) F (26.7)	N (60) F (40)	F (73.3) L (26.7)
24	N (100)	N (96.6) F (3.3)	N (80) F (13.3) L (6.7)	N (73) F (17) L (7) B (3)	N (46.7) F (10) L (30) B (6.7) M(6.7)	N (50) F (33.3) L (10) B (6.7)	F (70) L (23.3) B (6.7)
48	N (100)	N (83.3) F (10) L (3.3) M(3.3)	N (76.6) F (10) L (6.7) M(6.7)	N (63.3) F (13.3) L (6.7) B (6.7) M(10)	N (30) F (16.7) L (20) B (10) M(23.3)	N (33.3) F (30) L (13.3) B (6.7) M(16.6)	F (36.7) L (16.7) B (6.7) P (10) M (30)
72	N (100)	N (83.3) F (10) L (3.3) M(3.3)	N (66.7) F (13.3) L (3.3) M(16.7)	N (63.3) F (13.3) L (6.7) B (3.3) M(13.3)	N (26.7) F (16.7) L (20) B (10) M(26.7)	N (26.7) F (30) L (10) B (6.7) P (3.3) M(26.7)	F (23.3) L (16.7) B (6.7) P (13.3) M (40)
96	N (100)	N (83.3) F (10) L (3.3) M(3.3)	N (60) F (13.3) L (6.7) M(20)	N (46.7) F (13.3) L (6.7) B (6.7) M(26.7)	N (13.3) F (16.7) L (16.7) B (6.7) M(46.7)	F (13.3) L (16.7) B (16.7) P (3.3) M(50)	L (13.3) B (3.3) P (16.7) M (66.7)

N: normal, F: ubicación en fondo del acuario, L: letargo, M: Mortalidad, B: boqueo acelerado, P: pérdida equilibrio; (n = 30 peces por concentración).

DISCUSIÓN

A nivel fisiológico, el fosfato es un compuesto estructural y funcional esencial en la química de la vida. El ATP es la principal molécula de transferencia de energía en la célula y participa en numerosas reacciones metabólicas, ello lo convierte en la moneda de cambio de la energética celular. En los peces, los principales nucleótidos trifosfatos presentes son el ATP y GTP, que desempeñan un rol de gran relevancia en situaciones como la hipoxia y la anemia, las cuales comprometen el suministro de oxígeno. Una forma rápida para compensar los cambios en la disponibilidad de oxígeno disuelto (por anemia e hipoxia) es mediante ajustes de los niveles de ATP y GTP intracelulares en los eritrocitos. En la anemia se da una disminución de la afinidad del oxígeno en sangre provocada por un aumento de ATP-GTP. En hipoxia sucede lo contrario, los niveles de ATP-GTP disminuyen; sin embargo ambos procesos garantizan la entrega de oxígeno a los tejidos (Brauner & Wang, 1997; Val, 2000).

A nivel ecosistémico, otros factores que también afectan la transferencia de oxígeno son los cambios de temperatura, pH y del nivel de agua y los niveles de contaminación. Ante estos cambios, la estrategia que muestran los organismos son cambios en los niveles de ATP y GTP encargados de compensar por la disminución del oxígeno. Los procesos metabólicos a nivel del fosfato orgánico (ATP y GTP) en los eritrocitos para llevar a cabo los ajustes anteriores aún son desconocidos (Val, 2000).

En *S. multipunctata* se observaron alteraciones a nivel branquial y conductual que permiten suponer que en los peces se dio una falla en la incorporación del oxígeno y que probablemente esto fue debido a que los niveles de ATP y GTP se vieron afectados.

Por otro lado, es posible que la incorporación de las sales del fosfato de sodio ejerciera un efecto en la osmorregulación, ya que el sodio es un ión que los peces toman del ambiente para mantener el equilibrio iónico. El intercambio iónico entre el pez y

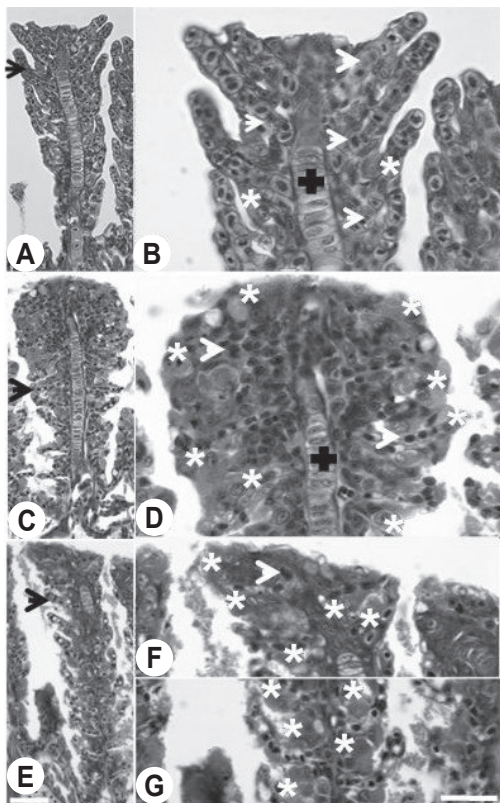


Figura 1. Fotomicrografías que ilustran ejemplos representativos de cortes longitudinales de branquias de peces control al día 13 (A-B), expuestos a 5.86 mg/L al día 13 (C-D) y a 8.79 mg/L al día 10 (E-G) de fosfatos. Los asteriscos señalan a las células Cloro (C), las puntas de flecha a los capilares, los puntos a las células Pilar (P), y las flechas negras a los ejes cartilaginosos de las lamelas primarias (Lp). Las lamelas secundarias se denotan como (Ls). Las escalas menor y mayor corresponden a 20 y 100 micrómetros, respectivamente.

el ambiente se lleva a cabo principalmente por las células cloro presentes en la branquia (Evans *et al.*, 2005), por lo que el estado óptimo de estas células es clave para dicha función. Consecuentemente si en estas células se presentan alteraciones (morfológicas, proliferación) es de suponer que habrá desequilibrios iónicos en el organismo.

Para *S. multipunctata*, la CL_{50-96} h del fosfato de sodio evaluada en el presente estudio resultó en 1.4 mg/L. En la exposición a mayor tiempo (efecto subletal y conducta 13 y 25 días respectivamente), el fosfato de sodio ocasionó severas alteraciones a nivel branquial, entre las que se incluyeron: atrofia, hiperplasia y fusión lamelar, las cuales fueron dependientes de la concentración del tóxico y del tiempo de exposición. Los cambios morfológicos de las branquias se reflejaron en la conducta de los peces, lo que permite suponer que el daño a nivel branquial fue determinante en los cambios de conducta. Lo anterior, es debido a que la branquia juega un papel central en una serie de respuestas

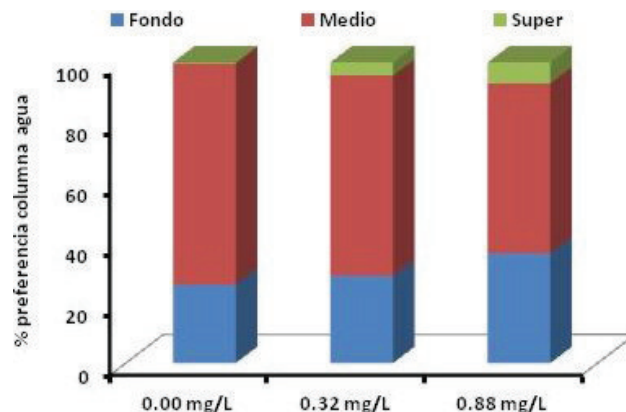


Figura 2. Porcentaje de la presencia de los peces en la superficie de la columna de agua por tratamiento, durante la exposición a los fosfatos.

fisiológicas a los cambios ambientales e internos ya que además de realizar el intercambio gaseoso, en su epitelio se llevan a cabo los procesos de transporte que contrarrestan los efectos de gradientes iónicos y osmóticos. Asimismo, en la branquia se lleva a cabo la regulación del pH de los fluidos corporales y la excreción de desechos nitrogenados (Evans, 1987; Bindon *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 2005). Al ser la branquia un tejido en contacto permanente con el agua es blanco constante de los diversos contaminantes presentes en el medio.

Por otro lado, estudios previos muestran que independientemente de la naturaleza del contaminante, la branquia presenta lesiones celulares como las antes mencionadas además de aneurismas, entre otros. Estas patologías de la branquia son respuestas comunes en peces a una amplia variedad de contaminantes acuáticos (Evans, 1987; Camargo & Martínez, 2007; Boran *et al.*, 2012).

En *S. multipunctata*, las lamelas primarias tendieron a la inflamación y las lamelas secundarias se mostraron fusionadas. Si bien, estas alteraciones pueden disminuir la entrada del fosfato a la branquia también provocan que se aumente el área de difusión entre el agua y la sangre; además de que la fusión de lamelas secundarias causa una falla en el intercambio gaseoso (Ahmad *et al.*, 2011). Estas alteraciones reducen la captación de oxígeno por parte de la branquia, motivo por el cual los peces pueden mostrar diversos cambios de conducta. En los experimentos realizados en el presente estudio, los niveles de oxigenación fueron los adecuados para la especie ($O_2 > 6.5$ mg/L), por lo que la presencia en la parte superficial de la columna de agua y la disminución del número de peces activos durante la alimentación fueron respuestas de los peces a su limitada capacidad para captar el oxígeno debido a las alteraciones en la branquia. Kramer (1987) indica que ante bajos niveles de oxígeno disuelto, los peces exhiben ciertas respuestas con el objeto de minimizar el consumo de energía,

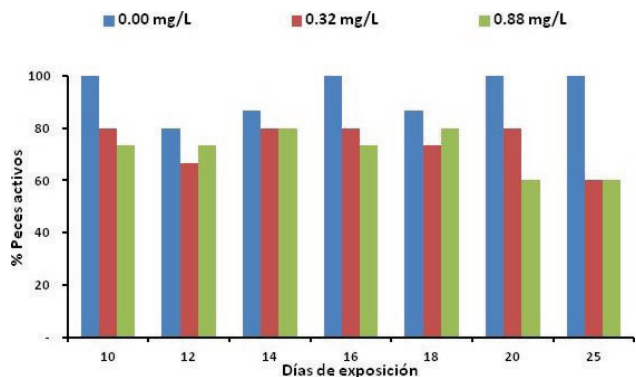


Figura 3. Porcentaje de las crías de *S. multipunctata* activas en durante cinco minutos en el periodo de alimentación en los 25 días de exposición a los fosfatos en los tres tratamientos. Las letras denotan grupos formados de acuerdo a los peces activos en los tratamientos.

éstas incluyen disminución de la actividad, respiración de aire atmosférico (en especies que tienen la capacidad para ello), respiración en la capa superficial de la columna de agua y cambios de hábitat.

Por su parte, en los ecosistemas acuáticos, el fosfato desempeña un papel clave ya que es la forma soluble y asimilable y consecuentemente la forma en que las plantas y el fitoplancton pueden consumirlo para realizar la productividad primaria. En ambientes conservados, el fosfato puede ser el nutriente limitante en la productividad primaria, pero en los ecosistemas degradados a consecuencia del uso desmedido de fertilizantes y detergentes fosfatados la concentración de éste se ha incrementado. Esto ha generado problemas de eutroficación y deterioro en muchos cuerpos de agua. No obstante que las concentraciones de fosfatos (fósforo total) en los cuerpos de agua del área de distribución de los peces goodeidos como en el manantial la Mintzita (21.98 mg/L, Ledesma, 2001), lago de Cuitzeo (14.98 mg/L, Herrera, 2007) y la región del bajo Lerma (30.91 mg/L, Cuevas *et al.*, 2011) son elevadas, el mayor número de estudios se ha enfocado a conocer los efectos de los organofosforados, en tanto que los efectos de los fosfatos en peces no se han estudiado. Otro aspecto relevante es que la Norma Oficial Mexicana NOM 001 SEMARNAT 1996, fija los valores máximos permisibles para fósforo total en 5 y 10 mg/L en promedio mensual y diario respectivamente para la protección de la vida acuática. Sin embargo, las concentraciones utilizadas en el presente estudio y que causaron daños a los peces están por debajo de las registradas en los cuerpos de agua del área de distribución de los goodeidos así como de las establecidas en la NOM.

S. multipunctata es una especie en peligro (NOM 059-ECOL 2010, Jelks *et al.*, 2008), que al igual que gran número de especies del grupo de los goodeidos ha sido escasamente estudiada. Esta y otras especies nativas y endémicas han disminuido sus pobla-

ciones y áreas de distribución como resultado de la pérdida de hábitat (Domínguez-Domínguez, 2008). Por lo anterior, el presente estudio establece las bases para continuar investigando las alteraciones que ejercen los fosfatos en los peces a concentraciones elevadas y resalta la importancia de profundizar en el estudio de los cambios a nivel fisiológico que provocan este compuesto.

REFERENCIAS

- AHMAD, H., M. SIKDAR-BAR, K. B. A. ABDULLAH & P. AHMED. 2011. Lead nitrite induced histopathological changes in the gills of the African Clarias *Batrachus*. *Journal of Applied Sciences Research* 7 (7): 1081-1086.
- ARELLANO-AGUILAR, O. & C. MACÍAS. 2009. Effects of methyl parathion exposure on development and reproduction in the viviparous fish *Girardinichthys multiradiatus*. *Environmental Toxicology* 24 (2): 178-186.
- ARELLANO-AGUILAR, O. & C. MACÍAS-GARCÍA. 2008. Exposure to pesticides impairs the expression of fish ornaments reducing the availability of attractive males. *Proceedings of Royal Society B: Biological Sciences* 275: 1343-1350.
- BINDON, S., K. GILMOUR, J. FENWICK & S. PERRY. 1994. The effects of branchial chloride cell proliferation on respiratory function in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology* 197: 47-63.
- BORAN, H., E. CAPKIN, I. ALTINOK & E. TERZI. 2012. Assessment of acute toxicity and histopathology of the fungicide captan in rainbow trout. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64 (3): 175-179.
- BRAUNER, C. J. & T. WANG. 1997. The optimal oxygen equilibrium curve: A comparison between environmental hypoxia and anemia. *American Zoologist* 37: 101-108.
- CAMARGO, M. P. & B. R. MARTINEZ. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology* 5 (3): 327-336.
- CUEVAS, A. R., M. R. CORTÉS, A. I. ISRADE, A. Y. CARREÓN, T. M. MARTINEZ, A. CABRERA & O. MEDINA. 2011. Producto 1. Informe sobre la calidad del agua, sedimentos y suelos en el meandro de La Piedad, Michoacán. In: Rueda-Jasso, R. A. (Coordinador general del proyecto). *Saneamiento del cauce natural (meandro) del río Lerma e integración del mismo a la dinámica urbana de La Piedad Michoacán*. Informe Técnico Final del proyecto FOMIX 7388128.
- DE LA VEGA-SALAZAR, M. 2006. Estado de conservación de los peces de la familia Goodeidae (Cyprinodontiformes) en la mesa central de México. *Revista de Biología Tropical* 54 (1): 163-177.
- DÍAZ-PARDO, E., M. A. GODÍNEZ-RODRÍGUEZ, E. LÓPEZ-LÓPEZ & E. SOTO-GALERA. 1993. Ecología de los peces de la cuenca del río Lerma, México. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* 39: 103-127.
- DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O. 2008. Filogeografía de *Zoogoneticus quitzeensis*, *Xenotoca variata* y *Allophorus robustus* (Cyprinodontiformes: Goodeidae) en el Centro de México: implicaciones taxonómicas y de conservación. Tesis de doctorado. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. UNAM, México, 241 p.

- DOMÍNGUEZ, D. O. & P. G. PÉREZ. 2007. Los goodeidos, peces endémicos del centro de México. *CONABIO. Biodiversitas* 75: 12-15.
- DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O., N. MERCADO-SILVA, J. LYONS & H. J. GRIER. 2005. The viviparous goodeid fishes. In: Uribe, M. C & H. J. Grier (Eds.). *Viviparous fishes. New Life*. México, pp. 525-569.
- EVANS, D. 1987. The Fish Gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives* 71: 47-58.
- EVANS, D., P. PIERMARINI & K. CHOE. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews* 1: 97-177.
- FONTÚRBEL, R. F. 2005. Indicadores fisicoquímicos y biológicos del proceso de eutrofización del lago Titikaka (Bolivia). *Ecología Aplicada* 4 (1-2): 135-141.
- HERRERA, L. 2007. Evaluación de metales pesados y arsénico en agua y sedimentos del lago de Cuitzeo. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. Morelia, Mich. 105 p.
- HUIDOBRO, C. L. 2000. Peces. In: De la Lanza, E., P. Hernández & P. Carbajal (Eds.). *Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores)*. Plaza y Valdes. México, pp 196-206.
- JELKS, L. H., S. WALSH, M. BURKHEAD, S. CONTRERAS-BALDERAS, E. DÍAZ-PARDO, A. HENDRICKSON, J. LYONS, E. MANDRAK, F. MCCORMICK, J. NELSON, P. PLATANIA, A. PORTER, B. RENUAD, J. SCHNOTTER-SOTO, B. TAYLOR & M. L. WARREN. 2008. Conservation status of imperiled North America freshwater and diadromus fishes. *Fisheries* 33 (8): 373-407.
- KRAMER, D. 1987. Dissolved oxygen and fish behavior. *Environmental Biology of Fishes* 18: 81-92.
- LEDESMA, F. A. 2001. Calidad del agua de la presa La Mintzita, Michoacán. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. Morelia, Mich. 81 p.
- LÓPEZ-LÓPEZ, E., J. SEDEÑO-DÍAZ, C. SOTO & L. FAVARI. 2011. Responses of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and Na⁺/K⁺-ATPase in liver of the fish *Goodea atripinnis* exposed to Lake Yuriria water. Elsevier. *Fish Physiology and Biochemistry* 37: 511-522.
- LYONS, J., G. GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, E. SOTO-GALERA & M. GUZMÁN-ARROYO. 1998. Decline of freshwater fishes and fisheries in selected drainages of West-Central Mexico. *Fisheries* 23: 10-18.
- NOM-001-SEMARNAT (NORMA OFICIAL MEXICANA). 1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. 6 de enero 1997.
- NOM-059-ECOL-2010 (NORMA OFICIAL MEXICANA). 2010. Protección Ambiental-Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestres- Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio-Lista de Especies en Riesgo. Diario Oficial de la Federación. México, D. F. Diciembre 2010.
- OCDE (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). 2008. Guidelines for the testing of chemicals, available online at: http://www.oecd.org/.../0,3343,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html (Downloaded 19 January 2010).
- ORTIZ-ORDOÑEZ, E., E. URÍA-GALICIA, R. RUIZ-PICOS, A. SÁNCHEZ, Y. HERNÁNDEZ, J. SEDEÑO-DÍAZ & E. LÓPEZ. 2011. Effect of Yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and Histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61: 443-452.
- SEDEÑO-DÍAZ, J. & E. LÓPEZ-LÓPEZ. 2007. Water quality in the Río Lerma, México: an overview of the last quarter of the twentieth century. *Water Resources Management* 21: 1797-1812.
- SMIL, V. 2000. Phosphorus in the environment: natural flows and human interferences. *Annual Review of Energy and the Environment* 25: 53-88.
- SMITH, V. H., G. D. TILMAN & J. C. NEKOLA. 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution* 100: 179-196.
- SOKAL, R. & J. ROHLF. 2000. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman, New York. 887 p.
- SONDERGAARD, M. & E. JEPPESEN. 2007. Anthropogenic impacts on lake and stream ecosystems, and approaches to restoration. *Journal of Applied Ecology* 44: 1084-1094.
- TEJEDA-VERA, R., E. LÓPEZ-LÓPEZ & J. SEDEÑO-DÍAZ. 2007. Biomarkers and bioindicators of the health condition of *Ameioba splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameioba River, Mexico. *Environmental International* 33: 521-531.
- VAL, A. L. 2000. Organic phosphates in the red blood cells of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 125: 417-435.
- WESTER, P., M. BURTON & E. MESTRE-RODRÍGUEZ. 2001. Managing the water transition in the Lerma-Chapala Basin, Mexico. In: Abernethy, C. L (Ed.). *Intersectoral Management of river basins* International Water Management Institute. Colombo. pp. 161-181.
- WIND, T. 2007. The Role of Detergents in the Phosphate-Balance of European Surface Waters. available online at http://www.ewaonline.de/journal/2007_03.pdf (downloaded January 10, 2011)
- ZHANG, R., F. WU, C. LIU, W. LI, L. WANG, H. LIAO & J. CUO. 2008. Characteristics of organic phosphorus fractions in different trophic sediments of lakes from the middle and lower reaches of Yangtze River region and Southwestern Plateau, China. *Environmental Pollution* 152: 366-372.

Recibido: 17 de octubre de 2011.

Aceptado: 26 de noviembre de 2013.