



Universidad de Quintana Roo

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍAS

Evaluación del crecimiento de la especie *Oreochromis niloticus* como bioindicador de la contaminación por herbicidas del grupo químico triazinas mediante un ensayo agudo y subcrónico de toxicidad.

TESIS RECEPCIONAL

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTAN

Grisel Anahí Cervantes Cocom

Camilo Gabriel Chan Ceh

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Víctor Hugo Delgado Blas

Chetumal Quintana Roo, México, Agosto de 2011.

UNIVERSIDAD DE QUINTANA ROO

Tesis elaborada bajo la supervisión del comité de asesoría y aprobada como requisito parcial para obtener el grado de:

LICENCIADO EN INGENIERÍA AMBIENTAL

COMITÉ

DIRECTOR

Dr. Víctor Hugo Delgado Blas

ASESOR PROPIETARIO

Dr. Adrián Cervantes Martínez.

ASESOR PROPIETARIO

Dra. Martha Angélica Gutiérrez Aguirre.

ASESOR SUPLENTE

Biól. Laura Patricia Flores Castillo.

ASESOR SUPLENTE

Q. F. B. José Luis González Bucio.

Chetumal Quintana Roo, México, Agosto de 2011.

DEDICATORIA

A Dios:

Sin él nada sería posible

A nuestros padres:

Vicente Samuel Cervantes Ramírez y María Obdulia Cocom

Ernesto Chan Sánchez y María del Rocío Ceh Chi

A nuestros hermanos:

Fabián, Judith y Sinaí

Zeyda, Ernesto, Roberto y Margarita

“Los amamos”

AGRADECIMIENTOS

A nuestro director de tesis Dr. Víctor Hugo delgado Blas, por haber sido nuestro tutor y por todo el apoyo recibido durante la realización de esta tesis.

Al Lic. Russel Giovanni Uc Peraza por su apoyo en el análisis estadístico y valiosos consejos para mejorar este trabajo.

Al M.C Víctor Miranda Soberanis por el tiempo en las asesorías en el área estadística

Al Dr. José Manuel Carrión Jiménez por su apoyo en el área de espectrofotometría

A nuestros asesores del comité de tesis, Dr. Adrián Cervantes Martínez, Dra. Martha Angélica Gutiérrez Aguirre. Biól. Laura Patricia Flores Castillo, por el tiempo empleado en revisar este trabajo de tesis y sugerir las recomendaciones para que pudiéramos realizar las correcciones necesarias

Al Centro de Estudios Tecnológicos del Mar # 10 por proporcionarnos juveniles de tilapia del Nilo.

A nuestros maestros y maestras de la carrera: gracias por compartirnos sus conocimientos

A nuestros amigos y amigas: gracias por la confianza y el afecto incondicional; por sus consejos y su colaboración

A todas las personas, dependencias y organizaciones, que de una u otra forma contribuyeron en la realización de esta investigación experimental.

Este trabajo fue financiado bajo la Convocatoria 2011 del Programa de Jóvenes Investigadores (PROJI) de la Universidad de Quintana Roo bajo el proyecto PROJI-2011*02-04. Evaluación del crecimiento de la especie *Oreochromis niloticus* como bioindicador de la contaminación por herbicidas del grupo químico Triazinas mediante un ensayo agudo y subcrónico de toxicidad.

ÍNDICE GENERAL	Página
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE ANEXOS	II
GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	IX
RESUMEN	1
CAPITULO I	
I. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Antecedentes	7
1.2. Justificación.....	10
1.3. Objetivo general	10
1.4. Objetivos particulares.....	10
1.5. Hipótesis.....	11
II. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Importancia de los peces en los ambientes acuáticos.....	12
2.2. Los peces como organismos indicadores	13
2.3. Especie de prueba.....	14
2.4. Características de la especie como bioindicador	15
2.5. Requerimientos ambientales	16
2.6. Tóxico de prueba.....	16

CAPITULO III

III. MÉTODOS Y MATERIALES	18
3.1. Transporte y aclimatación	18
3.2. Numero de organismos.....	18
3.2.1. Ensayo agudo	18
3.2.2. Ensayo subcrónico.....	19
3.3. Selección de las concentraciones	19
3.4. Realización del bioensayo agudo	20
3.4.1. Determinación de la Concentración Letal Media (CL ₅₀).....	21
3.4.2. Determinación del Error Patrón	22
3.5. Realización del bioensayo subcrónico.....	24
3.5.1. Análisis gravimétrico	25
3.5.2. Determinación del campo de Crecimiento	26
3.6. Métodos estadísticos.....	28
IV. RESULTADOS	30
4.1 Ensayo Agudo	30
4.1.1. Parámetros Fisicoquímicos	30
4.1.2. Cálculo de la CL ₅₀	30
4.1.3. Error Patrón.....	33
4.1.4. Resultados del Análisis Estadístico.....	35
4.2 Ensayo Subcrónico.....	40
4.2.1. Parámetros fisicoquímicos	40
4.2.2 Resultados del análisis gravimétrico	41
4.2.3 Resultados del Campo de crecimiento	42

V. DISCUSIÓN	54
5.1. Ensayo Agudo	54
5.2. Ensayo subcrónico.....	59
VI. CONCLUSIONES	63
VII. RECOMENDACIONES	64
VIII. LITERATURA CITADA	65
IX. ANEXOS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formula desarrollada de la atrazina.....17

Figura 2. Comportamiento del porcentaje de mortalidad en las diversas concentraciones del bioensayo agudo.....31

Figura 3. Determinación de la CL₅₀ por el método Probit32

Figura 4. Promedio de la variable muertos por concentración de atrazina.36

Figura 5. Promedio de Mortalidad en concentraciones de efectos no observables38

Figura 6. Promedio de Mortalidad en concentraciones de efectos observables39

Figura 7. Promedio de la variable muertos para los grupos de réplicas40

Figura 8. Tasa de ingestión de la especie *oreochomis niloticus* durante 21 días en el bioensayo subcronico.....47

Figura 9. Eficiencia de asimilación de la especie *oreochomis niloticus* durante 21 días en el bioensayo subcronico.....47

Figura 10. Asimilación de la especie *oreochomis niloticus* durante 21 días en el bioensayo subcronico.....48

Figura 11. Crecimiento relativo por réplica de concentración durante el bioensayo subcrónico de toxicidad.....50

Figura 12. Crecimiento total por réplica de concentración durante el bioensayo subcronico de toxicidad.....50

Figura. 13. Correlación entre las réplicas de concentración y el campo de crecimiento relativo para la especie *Oreochromis niloticus*, durante el bioensayo subcrónico de toxicidad.....51

Figura. 14. Correlación entre las réplicas de concentración y el campo de crecimiento total para la especie *Oreochromis niloticus*, durante el bioensayo subcrónico de toxicidad52

Figura. 15. Crecimiento de la especie *Oreochromis niloticus*, para el grupo control y crónico53

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Resultados finales obtenidos del bioensayo agudo con <i>Oreochromis niloticus</i>	30
Tabla 2. Datos de toxicidad de <i>Oreochromis niloticus</i> para el Método Probit	33
Tabla 3. Datos de toxicidad para el cálculo del Error Patrón	34
Tabla 4. Estadística descriptiva de la variable muertos para el bioensayo ecotoxicológico	35
Tabla 5. Análisis de varianza de la variable muertos.....	36
Tabla 6. Resultados del análisis de varianza del control y 6 ppm.....	37
Tabla 7. Resultados del análisis de varianza para el control y 7 ppm.....	37
Tabla 8. Resultados obtenidos de las muestras de <i>Oreochromis niloticus</i> ; Peso Húmedo (PH), Peso Seco (PS), Peso Seco Libre de Cenizas (PSLC) y Cenizas (C)	41
Tabla 9. Resultados del Alimento ofrecido (A), Alimento recuperado (B y C) y Alimento consumido (A-C) durante 21 días en el ensayo subcrónico con <i>Oreochromis niloticus</i>	42
Tabla 10. Tasa de ingestión (I) durante 21 días en el bioensayo subcrónico con <i>Oreochromis niloticus</i>	43
Tabla 11. Obtención de la proporción de PSLC/PS (F'), C/PS(Au) del alimento; PSLC/PS (E'), C/PS(Af) de las heces y proporción de las cenizas / peso seco entre alimento y heces (Au/Af) .	44
Tabla 12. Obtención de la eficiencia de absorción de la energía ingerida en el alimento (U'), %, y la Eficiencia de absorción corregida por la absorción de vitaminas y minerales (U*), % por medio de I, F', E' y Au/Af	45
Tabla 13. Asimilación del alimento ingerido (A) por medio de la ingestión (I) y eficiencia de asimilación U*	46
Tabla 14. Resultados del campo de crecimiento de <i>Oreochromis niloticus</i> (P1, P2, P3), por medio de Ingestión (I), Asimilación (A), Respiración (R) y Excreción Nitrogenada (U)	49
Tabla 15. Resultados de bioensayos de toxicidad aguda.....	56

ÍNDICE DE ANEXOS

Figuras

Figura. 16. Esquematización de la cámara de bioensayo previo	84
Figura. 17. Esquematización de la cámara de bioensayo agudo a 72 horas.....	85
Figura. 18. Esquematización de la cámara de bioensayo subcrónico a 21 días	86
Figura 19. Distribución normal de la variable muertos, mediante Kolmogorov-Smirnov.	87
Figura 20. Variable muertos con valores esperados de normalidad dentro de la elipse de confianza (95 %).	87
Figura 21. Normalidad de la variable muertos de acuerdo a las diferentes concentraciones de exposición	88
Figura. 22. Herbicida del grupo químico Triazinas	89
Figura. 23. Especie de prueba.....	90

Tablas

Tabla 16. Bioensayo exploratorio para la determinación de las concentraciones agudas	70
Tabla 17. Parámetros Físicoquímicos del bioensayo agudo a 72 horas	72
Tabla 18. Promedios Generales de los Parámetros del bioensayo agudo.....	73
Tabla 19. Observaciones de mortandad durante el bioensayo agudo	74
Tabla 20. Relación de % de mortalidad / Probit empírico	79
Tabla 21. Factor Ponderado (w)	79
Tabla 22. Promedios de los parámetros físicoquímicos medidos durante el bioensayo subcrónico con <i>Oreochromis niloticus</i>	80
Tabla 23. Parámetros físicoquímicos y Oxígeno consumido para la determinación de la tasa de respiración.....	81
Tabla 24. Peso seco (ps), cenizas (c) y materia orgánica (pslc) en g de las muestras de heces producidas por <i>Oreochromis niloticus</i> durante el bioensayo subcrónico.....	82
Tabla 25. Peso seco (ps), cenizas (c) y materia orgánica (pslc) en los equivalentes de alimento consumido por <i>Oreochromis niloticus</i> durante el bioensayo subcrónico	83

GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

cm	Centímetros
%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
mg/l	Miligramos por litro
g	Gramos
lts	Litros
ml	milímetros
pH	Potencial de Hidrógeno
OD	Oxígeno Disuelto
ppm	Partes por millón
ppb	Partes por billón
Pr	Probit empírico
PC	Probit Calculado
Ps	Peso Seco
PH	Peso Húmedo
Au	Cenizas sobre peso seco del alimento
Af	Cenizas sobre peso seco de las heces
PV	Peso vivo
IC	Intervalo de confianza
F'	Peso seco libre de cenizas sobre peso seco del alimento
E'	Peso seco libre de cenizas sobre peso seco de las heces
I	Tasa de ingestión
U	Excreción nitrogenada
U'	Eficiencia de asimilación
U*	Eficiencia de asimilación corregida
A	Asimilación
R	Tasa de respiración
C	Cenizas
P	Potencial de crecimiento
PSLC	Peso seco libre de cenizas
hrs	horas
NMX	Normas Mexicana
NOM	Norma Oficial Mexicana
CENO	Concentración máxima de efectos no observables
CEM	Concentración mínima de efectos observables
MCTP	Máxima concentración tóxica permitida
CL ₅₀	Concentración letal media
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HCL	Ácido clorhídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
ANOVA	Análisis de varianza
APHA	American Public Health Association
ATSDR	Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades
CETMAR	Centro de estudios tecnológicos del mar
CICOPLAFEST	Catalogo oficial de plaguicidas
CONABIO	Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad

Glosario de Abreviaturas y Acrónimos

ECOSUR	El colegio de la frontera sur
EPA	Enviromental Protection Agency
EUA	Estados unidos de América
OMS	Organización mundial de la salud
SAGARPA	Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación
SEMARNAP	Secretaria de medio ambiente, recursos naturales y pesca
UE	Unión europea
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN

Evaluación del crecimiento de la especie *Oreochromis niloticus* como bioindicador de la contaminación por herbicidas del grupo químico triazinas mediante un ensayo agudo y subcrónico de toxicidad.

RESUMEN

El empleo masivo de agroquímicos, incluyendo a los herbicidas, están causando diversos impactos en el ambiente, lo que ha llevado a cuestionar si éstas prácticas agrícolas están generando graves problemas de contaminación, que puedan afectar a los organismos vivos a corto, mediano y largo plazo.

A partir de los 70's en Estados Unidos, la EPA (Agencia de Protección Ambiental) ha realizado investigaciones, con el objetivo de establecer criterios de calidad del agua para diversas sustancias potencialmente tóxicas, en dichos estudios se han reportado los efectos adversos resultado de la exposición de animales terrestres y acuáticos a herbicidas.

Los herbicidas Triazínicos han sido usados durante 40 años, en más de 80 países y se pueden detectar en casi todas las superficies acuáticas del mundo (Diana *et al.* 2000). Estas entran al sistema acuático a través de lixiviación, escorrentía de campos agrícolas o a través de la aplicación directa para eliminar malezas acuáticas. Algunos autores han reportado que las Triazinas a ciertos niveles de concentraciones pueden producir cambios patológicos en los organismos acuáticos (Wiegand *et al.* 2001). De ahí la importancia de evaluar la toxicidad de las Triazinas a partir de bioensayos agudos y crónicos.

Los problemas de la contaminación acuática en México hacen necesario incrementar el actual conocimiento sobre los efectos ecotoxicológicos de los herbicidas en los organismos, esto con el fin de establecer estándares y criterios ambientales para proteger la biodiversidad y los ecosistemas. Los peces han sido usados en ensayos de toxicidad, más que ningún otro grupo de organismos acuáticos (APHA 1992). Consideramos que la especie *Oreochromis niloticus*, comúnmente llamada tilapia, es una buena indicadora porque tiene amplia producción, consumo e importancia económica para México.

El Objetivo de la presente investigación fue evaluar la afectación del crecimiento de la especie *Oreochromis niloticus* por exposición a herbicidas del grupo químico triazinas en un ensayo agudo y subcrónico de toxicidad.

Los bioensayos fueron llevados a cabo en juveniles, obtenidos del Centro de Estudios Tecnológicos del Mar (CETMAR n^o 10) de Chetumal y de Granjas acuícolas, En el laboratorio se seleccionaron y se aclimataron durante diez días. Los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo con el herbicida 6 cloro-N2-etil-N4 (isopropilamino) 1, 3, 5 – triazina (atrazina).

En el agudo se usaron seis concentraciones y el blanco con tres replicas cada uno. Las observaciones del estado de los organismos durante el bioensayo se llevaron a cabo durante 72 hrs. Se cuantificaron las muertes por replica de cada concentración para llevar a cabo el análisis Probit (NMX-AA-087-1995), con el fin de determinar la concentración letal media (CL₅₀) y un análisis de varianza para hallar la concentración máxima de efectos no observables (CENO), la concentración mínima de efectos observables (CEM) y la máxima concentración tóxica permitida (MCTP) (APHA, 1992) calculados según las diferencias estadísticas significativas con respecto al control. Como resultado se encontró que la CL₅₀ para *Oreochromis niloticus* fue de 8.36 mg/l, la CENO de 6 mg/l, la CEM de 7 mg/l y la MCTP de 6.5 mg/l \pm 0.01 según el análisis estadístico.

En el subcrónico se usó la MCTP encontrada en el ensayo agudo previo con 5 replicas y el blanco con 3 replicas. Las observaciones de los organismos durante el bioensayo se llevaron a cabo durante 21 días. Para la realización de la prueba nos basamos en la metodología sobre el balance energético de *Ctenopharyngodon idella* a través de un bioensayo crónico (Espina, 1986), y del Manual de métodos para la evaluación del balance energético en crustáceos del laboratorio de ecología y biología marina experimental de la Facultad De Ciencias de la UNAM (Rosas *et al.* 2003) y de los procedimientos para pruebas de toxicidad para peces de la APHA *et al.* (1992).

Concluimos que para la especie *Oreochromis niloticus* se recomienda una concentración máxima tolerable de 6.5 mg/l de triazina, ya que una concentración superior producirá efectos agudos como obscurecimiento, inflamación del vientre, desorientación, hipoxia y hasta la muerte, mientras que una concentración similar pero constante se producen efectos subcrónico como cambios en el comportamiento, inhibición del crecimiento, supresión del sistema inmune, cambios irreversibles en las células tejidos y en la reproducción.

Los análisis de varianza realizados para los bioensayos agudo y subcrónico a un nivel de confianza del 95% demostraron que las pruebas realizadas fueron significativas.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Con el incremento de la producción agrícola industrial en el Estado de Quintana Roo, aumentó el uso de sustancias químicas como pesticidas, herbicidas y fertilizantes para eliminar las plagas y malezas que deterioran el desarrollo de los cultivos, a su vez el empleo de estos productos ha generado problemas de contaminación que pueden afectar tanto al humano como a los integrantes de los diferentes ecosistemas. Sobre el herbicida, atrazina sabemos por Fischer-Scherl *et al.* (1991) que se ha encontrado hasta 3,5 mg/L en agua de lluvia, hasta 1,25 mg/L en aguas superficiales, más de 0,5 mg/L en agua subterránea y superior a 0,1 mg/L en agua potable en Europa, mientras que en E.U.A. se encontró de 88.4 mg/L hasta 69.4 mg/L en agua superficial. Lamentablemente en México no existe una información tan amplia sobre el nivel de contaminación de los cuerpos de agua por herbicidas (Escalante-Espinoza, 2000).

La atrazina es un herbicida (triazina sistémica) que ha sido usado por más de 40 años en más de 80 países y se puede detectar en casi todas las superficies acuáticas del mundo. Actualmente se sigue considerando como un herbicida de bajo riesgo ecológico debido a su débil acumulación y biomagnificación (Diana *et al.* 2000; Felsot, 2001). Sin embargo, recientemente algunos autores han reportado que los herbicidas a ciertos niveles de concentraciones pueden producir cambios patológicos en los organismos acuáticos (Wiegand *et al.* 2001).

Las triazinas entran al sistema acuático a través de la lixiviación, escorrentía de campos agrícolas o directamente a través de la aplicación directa para eliminar malezas acuáticas. También se conoce que por percolación los herbicidas pueden ser transportados en el suelo como moléculas disueltas en aguas, o ser absorbidos sobre la superficie de partículas coloidales y llegar hasta cuerpos de agua (Gómez, 2006). Por lo tanto se debe dar mayor importancia a los estudios sobre la afectación de los organismos acuáticos por la exposición a herbicidas, pues estos contaminantes pueden llegar a los cuerpos de agua todavía activos.

En diversos países entre los que se encuentra México, ya se presentan problemas en los ecosistemas acuáticos causados por herbicidas del grupo químico

triazinas, pues se afecta a especies que tienen una relación directa con los humanos, por ejemplo se ha demostrado que en la producción o cultivo de peces, como la tilapia, la muerte de peces en los estanques se debe principalmente a la atrazina, usada en campos agrícolas cercanos donde la utilización de 0,01, 10 y 1000 mg/L de atrazina produce alteraciones en los peces de cultivo (Aaronson,1980)

En México se ha determinado la toxicidad de ciertas sustancias en organismos acuáticos mediante bioensayos en organismos indicadores como crustáceos, peces, bivalvos y poliquetos. Los peces, debido a que son un componente importante de los ecosistemas acuático y una unidad clave en muchas cadenas alimenticias, pueden servir como bioindicadores ambientales. Cambios en la composición de una comunidad de peces suele indicar una variación en el nivel de contaminación, esta es la principal razón por la que los peces han sido usados en ensayos de toxicidad, más que ningún otro grupo de organismos acuáticos (APHA, 1992).

Para poder estimar los efectos tóxicos producto de la contaminación por herbicidas en los ambientes acuáticos, se ha recurrido a estudios convencionales sobre calidad del agua, que tratan de enlazar la afectación de una o varias especies, pero como menciona Encina (2000) aunque estos estudios disponen de una gran cantidad de datos analíticos, son incompletos, lo que dificulta la elaboración de un diagnóstico certero sobre la contaminación de un ambiente acuático y la comunicación de los resultados de una manera comprensible y confiable.

Para evaluar los efectos de la toxicidad aguda, que suelen presentarse cuando un contaminante entra en forma repentina y en altas concentraciones, y la toxicidad subcrónica que se da cuando un contaminante entra en forma constante pero en bajas concentraciones, se realizan bioensayos de laboratorio, que permiten establecer una relación causal entre las concentraciones ambientales y los efectos sobre una especie o varias (Encina, 2000); se usan para diferenciar los efectos de contaminantes de aquellos inducidos por otras perturbaciones y son capaces de descubrir concentraciones muy bajas de contaminantes (U.S Geological survey, 2000).

De manera general este trabajo se centra en evaluar la afectación en el crecimiento de la tilapia cuando es expuesta a una concentración subcrónica, obtenida mediante un ensayo agudo previo, durante un período de 21 días. El crecimiento de los peces, medido por el aumento en talla y peso, es influido por numerosos factores del medio que suelen estar estrechamente relacionados entre sí, como son; el oxígeno disuelto, temperatura del medio, pH, turbidez y fotoperiodo (Steffens, 1987), por lo que durante el desarrollo de las pruebas se controlaron y mantuvieron estos parámetros dentro los niveles óptimos.

Muchos investigadores creen que los criterios para evaluar los efectos de los herbicidas en los ambientes acuáticos, deben ser fijados por medio de parámetros derivados de bioensayos significativos, donde deben considerarse para ello efectos agudos, crónicos, letales y subletales, más algunas circunstancias particulares del ambiente (Larraín, 1995). Por lo anterior, consideramos de gran importancia evaluar mediante bioensayos la toxicidad de los herbicidas del grupo químico triazinas, específicamente atrazina por ser el más común, y usando la tilapia como organismo indicador. Cabe señalar que en la actualidad existen muy pocos datos sobre efectos de las triazinas en el metabolismo de peces ampliamente utilizado en piscicultura, es por esta razón que esta investigación experimental pretende estudiar el efecto de la atrazina en el crecimiento de esta la especie y contribuir a la ciencia acrecentando el escaso bibliográfico acervo actual.

1.1. Antecedentes

Los estudios sobre el balance energético en peces fueron iniciados con las investigaciones de Ivelev (1939) y crecieron rápidamente después de que Winberg (1956) publicara una revisión extensa sobre el tema. El balance energético de peces durante un periodo determinado de tiempo, puede describirse con un modelo ampliamente aceptado por la comunidad científica (Klekowski y Duncan, 1975) en donde se integran las tasas fisiológicas de los peces expresados en unidades de energía (Vega *et al.* 2004), sustituyéndose de la siguiente manera: $I = R + H + U + P$. Donde I es la energía ingerida en el alimento, contenida en forma de carbohidratos, lípidos o proteínas y puede ser expresada en masa, calorías o joules; R representa la energía utilizada en la respiración (metabolismo), U es la excreción, H energía eliminada en heces y P es la producción o energía retenida.

Uno de los primeros estudios sobre la afectación del balance energético debido a la presencia de contaminantes acuáticos y realizado por medio de bioensayos agudos y crónicos en un pez apto para el cultivo masivo, fue cuando Espina *et al.* (1986) evaluaron la influencia del detergente foca sobre el balance energético de juveniles de carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) a través de un bioensayo crónico de toxicidad.

Estudios recientes profundizan sobre la ruta metabólica de las triazinas y los efectos fisiológicos por ejemplo, Oropesa Jiménez (2009) analizó los efectos de la simazina en el metabolismo energético de la carpa común en un estudio de toxicidad subcrónica que duró 90 días, bajo condiciones de laboratorio y se expusieron a las carpas a 45 µg/l de simazina (concentración 10 veces superior a la máxima detectada en el medio acuático de España). La autora señala que este se realizó en base a la escasez de datos de toxicidad subcrónica existente sobre dicha sustancia en peces.

También, se han realizado estudios del balance energético de juveniles de *Chirostoma estor* (Jordan, 1879) (Pisces, Atherinopsidae) en relación con el tamaño corporal Vega *et al.* (2004), determinaron el flujo energético de los juveniles de *Chirostoma estor* de dos diferentes clases de peso ($P < 0.05$). Se midieron las respuestas fisiológicas y se integraron en la ecuación del balance energético con el fin

de estimar la energía potencial de crecimiento o campo de crecimiento que se canalizaría a crecimiento somático (Vega *et al.* 2004).

A partir de los 70's en Estados Unidos, la EPA ha estado realizando investigaciones, para establecer criterios de calidad del agua para diversas sustancias potencialmente tóxicas, en dichos estudios se han reportado los efectos adversos resultado de la exposición de animales terrestres y acuáticos a herbicidas. Para atrazina se realizaron estudios de exposición crónica en *Daphnia magna*, *Chironomus tentans*, *Gammarus fasciatus*, y peces *Lepomis macrochirus*, *Primephales promelas*, *Salvelinus fontinalis* (EPA, 1976).

Otro estudio sobre los efectos de la atrazina en el desarrollo de los organismos acuáticos es "El impacto de la toxicidad de la atrazina en cuatro vertebrados acuáticos" realizado por Wacksman *et al.* (2006) en el que se usaron anfibios y peces para ser expuestos a las mezclas de atrazina y otros herbicidas en bioensayos de toxicidad aguda y crónica, donde la atrazina combinada con otros herbicidas clorados incrementaron su toxicidad en concentraciones mayores a 1 mg/l, inhibiendo la actividad de la enzima colinesterasa.

Un gran número de científicos en todo el mundo, creen que la atrazina (junto con la pérdida de hábitats, especies invasoras y otras alteraciones en el ambiente) sería la responsable de la desaparición de distintas especies de anfibios y peces en las zonas agrícolas. Como ejemplo de estos estudios tenemos, el caso de la rana leopardo *Rana pipiens*, expuesta *in vivo* a bajas concentraciones de atrazina (herbicida) que ha demostrado el desarrollo de oocitos testiculares (hermafroditismo; a 0,1 ppb), así como una disminución en el contenido de células germinales, posiblemente debido a desmasculinización de las gónadas (fallo en la inducción de espermatogénesis) (Hayes *et al.* 2002).

Los efectos de los herbicidas en el medio acuático no sólo son importantes por la mortalidad que puedan causar de manera directa, sino por una diversa gama de disturbios neuroendocrinos y disminución de la resistencia a patógenos oportunistas (Rondón-Barragán *et al.* 2010).

En la zona sur de Quintana Roo de 1993 a 1995, se han realizado diversos estudios para evaluar la calidad del agua y también para caracterizar y medir la toxicidad acuática de la bahía de Chetumal y del río Hondo: Ortiz *et al.* (1997), con la colaboración de la 11a zona Naval Militar, realizaron un estudio para evaluar los niveles de plaguicidas organoclorados en sedimentos de las principales afluentes de México y Belice que desembocan en el río Hondo, considerando para ello 14 sitios desde la Unión hasta la desembocadura del río Hondo. Se determinó una alta concentración de compuestos y productos de plaguicidas de uso restringido o prohibido según el catalogo Oficial de plaguicidas (CICOPLAFEST).

En junio de 1996 hubo en la bahía una muerte masiva de bagres (*Arius assimilis*), por lo que a solicitud del gobierno del estado, El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) realizó un estudio para determinar las causas probables (Ortiz, 1997). Se realizaron estudios de patrones de circulación, salinidad, temperatura y oxígeno, nutrientes y plaguicidas en agua; además se hicieron encierros de peces en jaulas para determinar si el movimiento del ferry que estaba en funcionamiento, podría provocar la resuspensión de sedimentos y contaminantes que ocasionarían la muerte de los peces, encontrándose un aumento de nutrientes y plaguicidas después del paso del ferry.

Ortiz *et al.* (1997) determinaron la concentración de plaguicidas organoclorados e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en sedimento e hígado de peces muertos en 12 sitios localizados a lo largo de la costa occidental de la bahía y se usó a la laguna Milagros como referencia de un sitio no contaminado. La concentración de plaguicidas en peces fue similar tanto en la bahía como en la laguna Milagros.

En la mayoría de los estudios del ECOSUR efectuados de 1996 a la fecha, se ha concluido que al río Hondo llegan diversidad de contaminantes provenientes de la descarga de aguas residuales y de actividad agrícola de la rivera, residuos de plaguicidas, pesticidas y diversos herbicidas cuyo receptor final son la columna de agua y los sedimentos de la bahía, lo que indica una exposición crónica de los organismos acuáticos, que podrían causarles efectos tóxicos.

1.2. Justificación

Los bioensayos se utilizan para plantear normas de valoración ecotoxicológica de las aguas contaminadas con herbicidas, mediante las reacciones de organismos de los diferentes niveles tróficos y aportan valiosa información sobre los efectos letales y subletales del herbicida como contaminante del medio acuático.

Por lo que se pretende realizar, una serie de bioensayos con *Oreochromis niloticus*, amparada en la integración de métodos estandarizados e investigación para desarrollar un análisis más completo sobre los efectos que producen la exposición aguda y subcrónica de una población de peces al herbicida atrazina, con el objetivo de establecer un criterio para la valoración del agua contaminada con el herbicida de amplio uso 2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-1,3,5 triazina y proponer un intervalo de concentración tolerable del grupo químico triazina como punto final para el ambiente.

1.3. Objetivo general:

Determinar el nivel de toxicidad del herbicida atrazina y su potencial de afectación al campo de crecimiento de una población de *Oreochromis niloticus*, mediante un bioensayo agudo y subcrónico.

1.4. Objetivos específicos

1. Determinar la concentración letal media (LC_{50}) mediante el método Probit.
2. Determinar la concentración más alta del agente tóxico donde no se observan efectos adversos en la población expuesta, es decir la concentración de efectos no observables (CENO), la concentración más baja del agente tóxico a la cual se registran efectos adversos en una población expuesta o concentración de efectos mínimos (CEM) y la máxima concentración tóxica permitida (MCTP).

3. Determinar la tasa de ingestión (I), eficiencia de asimilación o absorción (U'), eficiencia de asimilación corregida (U^*), asimilación (A), tasa de respiración (R) y excreción nitrogenada (U), de la especie *Oreochromis niloticus*.

1.5. Hipótesis

La especie *Oreochromis niloticus* presenta alteraciones negativas en su potencial de crecimiento por la exposición a una concentración subletal del herbicida atrazina.

CAPÍTULO II
MARCO
TEÓRICO

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Importancia de los peces en los ambientes acuáticos

Los peces son un componente importante de los hábitats acuáticos, fuente de alimentos para los seres humanos y una unidad clave en muchas cadenas alimenticias, afectan y son afectados por las propiedades fisicoquímicas del sistema y otros organismos acuáticos. Por lo tanto si se afecta el medio acuático, sirven como indicadores ambientales, debido a que los cambios en la composición de una comunidad de peces suelen indicar una variación en el pH, la salinidad, el régimen de temperatura, los solutos, el oxígeno disuelto y el nivel de contaminación (APHA, 1992).

Los peces comparten muchas propiedades fisiológicas con los mamíferos y pueden ser utilizados tanto en el campo como en el laboratorio por el investigador como herramienta de trabajo. La relevancia del empleo de peces como organismos de prueba radica en su ubicación y función en los sistemas acuáticos, ya que además de ocupar diferentes posiciones tróficas en los ecosistemas, al tratarse de organismos vertebrados, son normalmente considerados como buenos representantes de organismos de mayor complejidad y por lo tanto los efectos tóxicos observados en ellos son más fáciles de comprender e interpretar (APHA, 1992).

Debemos concientizarnos de la problemática ambiental existente en nuestras costas para poder diseñar las estrategias de conservación de nuestros recursos. Cada vez se hace más necesario incluir en las reformas al programa de manejo de sistemas acuáticos, programas de monitoreo, pero también actualizar las normas de uso y procedimientos legales relacionados con el manejo de agroquímicos, ya que esto permitirá tener un manejo sustentables de nuestros recursos naturales, regresando a técnicas de control de maleza más amigables con el ambiente, estos cambios pueden beneficiarnos social, económica y culturalmente.

2.2. Los peces como organismos indicadores

De la Lanza-Espino (2000) menciona que los peces son viables para ser utilizados como organismos indicadores por las siguientes características:

1. La información de los ciclos de vida es muy completa para diversas especies; por ejemplo muchos peces se reproducen una vez al año y los periodos de desove son generalmente estables lo que permite planear las actividades de colecta.
2. Las comunidades de peces generalmente incluyen una gran variedad de especies, las cuales representan una variedad amplia de niveles tróficos como los omnívoros, herbívoros, insectívoros, planctívoros, piscívoros, en los que se incluyen alimentos tanto de origen acuático como terrestre. Su posición en la cima de la cadena trófica acuática en relación con las diatomeas e invertebrados también ayuda a proveer una visión integrativa de la salud del ambiente.
3. Los peces son relativamente fáciles de identificar, por la forma, el tamaño y la coloración.
4. Cuando se trasladan peces al laboratorio, el tiempo de manipulación y procesamiento es menor en comparación con otros grupos taxonómicos.
5. Los peces están presentes en los sistemas acuáticos, aun cuando estos sean ríos pequeños o aguas muy contaminadas.
6. Los peces son afectados por factores macroambientales, fáciles de ubicar, mientras que las algas e invertebrados están sujetas a influencias tanto micro como macro ambientales.
7. Los peces son relativamente de vida larga y por lo tanto incorporan varios periodos de evaluación de las condiciones ambientales.
8. Es fácil de determinar la anatomía de un pez cuando es sometido a un tipo de influencia anómala reflejándose en lesiones como tumores o deformidades en el cuerpo y aletas.

Las especies indicadoras, que muestran tolerancia principalmente a la contaminación de origen urbano, industrial y/o agrícola están en el primer grupo:

Oreochromis aureus, *Astyanax fasciatus*, *Sicydium multipunctatum* y *Agonostomus monticola*, que indican altas concentraciones de metales pesados en el agua; *Centropomus parallelus* y *Oreochromis niloticus* presencia de plaguicidas, herbicidas; *Goodea atripinnis*, *Xenotoca variata*, *Oreochromis mossambicus*, *Carasius auratus*, *Cyprinus carpio* y *Poeciliopsis infans* altas concentraciones de nitratos, sulfatos y fosfatos. Algunas especies tolerantes son introducidas a México con fines de acuicultura porque son resistentes. El segundo grupo lo conforman especies sensibles a pequeñas concentraciones de contaminantes, estas suelen emigrar. El tercer grupo de especies que viven en ambientes donde la influencia de la contaminación es casi nula, no se desarrollan en ambientes contaminados (De la Lanza-Espino *et al.* 2000).

2.3. Especie de prueba

Las Tilapias, son organismos tropicales dulceacuícolas originarios de África, los cuales, debido a su facilidad de adaptación se encuentran distribuidos en la mayoría de los países tropicales y subtropicales con fines de cultivo (Fig. 23). Dentro de sus áreas originales de distribución, las Tilapias han colonizado hábitats diversos, pues es un pez de aguas cálidas, dulces, salobres o salinas que puede adaptarse a aguas con baja concentración de oxígeno (SAGARPA, 2011). Las tilapias alcanzan una talla promedio de alrededor de 30 cm en estado adulto y pueden llegar a pesar de 1-3 Kg, generalmente el macho se desarrolla más que la hembra, se clasifica como Omnívoro y aceptan fácilmente los alimentos suministrados artificialmente (Saavedra-Martínez, 2006). Es un buen indicador de la Contaminación industrial o agrícola, indicador de plaguicidas organoclorados (De la Lanza-Espino 2000).

Con base a lo anterior es más viable emplear una especie tolerante para realizar un bioensayo de toxicidad con herbicidas, pues la especie *Oreochromis niloticus* puede presentarse en ambientes contaminados con plaguicidas y herbicidas a diferencia de especies sensibles que viven en ambientes donde la influencia de estos contaminantes prácticamente no existe. Es decir no tendría utilidad para evaluar a una especie con un tóxico que en su ambiente ni siquiera está expuesto a herbicidas.

En general la especie *Oreochromis niloticus* es un organismo indicador de la calidad de agua y de la contaminación por herbicidas, de importancia económica y fácil de identificar, es adaptable y abundante, que además podría representar la problemática de la toxicidad de los herbicidas en los organismos acuáticos, y puede ser útil para determinar la calidad de los cuerpos de agua, Otro aspecto que los hace viable es que su cultivo y mantenimiento en el laboratorio es económico, debido a su tamaño los efectos de los contaminantes son observables a simple vista, por lo que no se requiere de un equipo especializado. Además se cuenta con mucha información individualmente acerca de los peces y el herbicida, así como de la metodología necesaria para la realización de los bioensayos. El herbicida atrazina de la marca comercial Gesapax® puede ser obtenido directamente de la zona agrícola o de cualquier agroveterinaria donde se vendan productos agrícolas.

2.4. Características de la especie como bioindicador

Se seleccionó la especie de acuerdo a los siguientes criterios (APHA, 1992):

- a) La especie deberán encontrarse o estar estrechamente relacionadas con las especies que se encuentran en el agua o con el residuo que se ensaya.
- b) Deberá disponerse de la especie en número suficiente para los ensayos.
- c) La especie deberá poderse mantener en el laboratorio en buen estado (es decir activas, alimentadas, con orientación apropiada, ausencia de lesiones, etc.) y
- d) La especie habrá de representar un importante enlace trófico en el ecosistema del agua que se recibe o recurso económico para diversas comunidades.

Siguiendo la indicación de que la especie debe encontrarse en relación con el toxico que se desea analizar, se consultó una lista parcial de peces de agua dulce que han sido usados para ensayos de toxicidad con pesticidas o herbicidas desarrollado por el instituto de biología de la UNAM y la desaparecida secretaria SEMARNAP en colaboración con De la Lanza-Espino (2000), seleccionando *Oreochromis niloticus* una especie cultivada en Quintana Roo, es posible realizar un bioensayo en laboratorio considerando que esta es parte de un cierto número de peces de agua dulce que han

sido cultivados a través de más de una generación y han sido expuestas a herbicidas como la atrazina destinada a maleza acuática.

2.5. Requerimientos ambientales

Manuales de Producción de Tilapia en México, editados por la SAGARPA, recomiendan que para su desarrollo es necesario mantener valores óptimos en los siguientes factores:

- a) **Temperatura:** Los rangos óptimos oscilan entre 25 y 30°C, aunque puede soportar temperaturas menores, se compromete el crecimiento.
- b) **Oxígeno Disuelto:** Los valores más convenientes para el cultivo son los mayores de 4 mg/l. Aunque puede soportar bajas concentraciones de hasta 1mg/l, a menor concentración de OD el consumo de alimento y el crecimiento se reducen.
- c) **pH:** Los valores óptimos están entre 7 y 8, porque no toleran valores menores de 5 pero resisten valores alcalinos de 11.
- d) **Turbidez:** Para que las partículas sólidas suspendidas, no causen problemas e interferencias, se debe mantener 30 cm de visibilidad (lectura del Disco Secchi).
- e) **Luz o luminosidad:** Puede utilizarse iluminación natural o artificial, se recomienda de 12-14 horas de luz.

2.6. Tóxico de Prueba

Las pruebas de toxicidad, se realizaron con el herbicida Atrazina: $C_8H_{14}ClN_5$ que es herbicida selectivo de preemergencia y postemergencia temprana utilizada para el control de malezas en espárragos, maíz, sorgo, caña de azúcar y piña (Gómez, 2006). Se ha encontrado en aguas superficiales y subterráneas, debido a su movilidad en el suelo. Es relativamente estable en suelos y medios acuáticos, con un periodo de semidegradación del orden de meses, pero se degrada por fotólisis y por la acción microbiana en el suelo, en la actualidad varios países han restringido su uso (OMS, 2003).

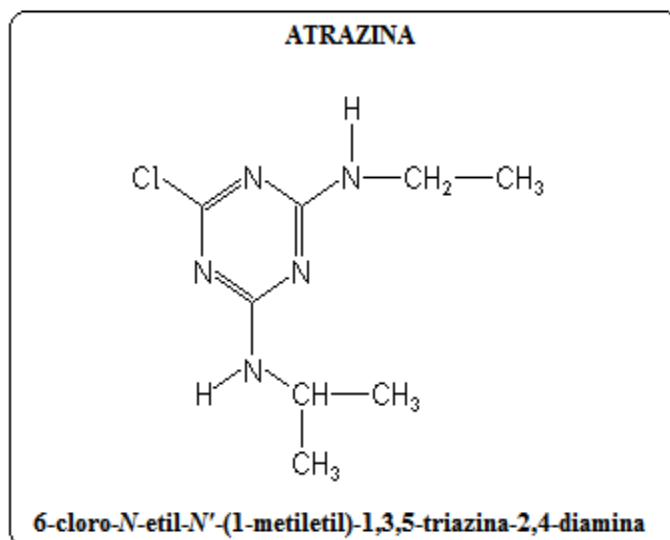


Figura 1. Formula desarrollada de la atrazina

Tiene una persistencia de 3 a seis meses, dependiendo del tipo de suelo, dosis y factores climáticos; aunque puede extenderse hasta un año. Se considera que no es tóxico para las abejas pero sí para los invertebrados acuáticos, aunque en el suelo todavía no se ha determinado la toxicidad de sus productos y principales metabolitos, desetilatrizona y la hidroxiatrizona. Es combinable con otras Triazinas como la ametrina y la prometrina (Gómez, 2006). La atrazina no tiende a acumularse en organismos vivos tales como algas, bacterias, almejas o peces, y por lo tanto, no se acumula en la cadena alimentaria (ATSDR, 2003).

Sobre su concentración en el agua, en muchos países se ha reportado que después de la aplicación en zonas agrícolas, la atrazina se ha encontrado en aguas subterráneas en niveles de 0,01 a 6 mg/l y también se ha detectado en el agua potable en varios países con niveles de 0.01 a 5 mg/l (OMS, 2003).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

III. METODOLOGÍA

3.1. Transporte y Aclimatación

Los experimentos se llevaron a cabo con peces juveniles, obtenidos del Centro de Estudios Tecnológicos del Mar (CETMAR) de Chetumal, se transportaron al laboratorio en depósitos de plástico de 90 lts, posteriormente se pusieron los organismos en palanganas con una capacidad de 30 lts, proporcionándoles alimento con una dieta de purina a base de proteínas, grasas, carbohidratos y fibra en base seca, una vez al día al 8 % de su peso corporal, determinado mediante el pesado de los organismos que morían durante la aclimatación. Se les mantuvo con este alimento durante el periodo de aclimatación de 10 días. Para prevenir enfermedades, parásitos, bacterias, o algún tipo de alteraciones o muerte en los peces e influyeran en los resultados de los bioensayos, se adicionó 1 g de sal desinfectante.

Para verificar que los peces estuvieran en buenas condiciones se vigilaban y se observaba si sufrían algún tipo de estrés o daños físicos y éstos se retiraban, así como aquellos que morían o presentaban anomalías y si moría un 10% por cada población ésta era descartada de los bioensayos.

Los parámetros fisicoquímicos que se midieron fueron temperatura del agua (25-29 °C), concentración de oxígeno disuelto (6-7 mg/l) y el pH (7-8); con oxímetro HANNA-9142 y potenciómetro- termómetro, HANNA-HI-99131. Estos parámetros fueron determinados diariamente durante el bioensayo para conocer y regular las condiciones en las que se encontraban los peces.

3. 2. Número de organismos

3.2.1 Bioensayo agudo

Se seleccionaron 18 peces aclimatados para exponer a cada concentración del herbicida, divididos en tres replicas con 6 peces por depósito (30 lts), seleccionando peces de tamaño uniforme (10-14 cm), sin que el más largo tuviera una longitud superior a 2 veces el más corto en cada depósito. En total fueron noventa organismos

para el primer bioensayo agudo exploratorio y ciento veintiséis para el bioensayo agudo definitivo debido a que se utilizaron siete concentraciones incluido el blanco para este bioensayo agudo, siendo cinco el mínimo de concentraciones requeridas (APHA, 1992).

3.2.2 Bioensayo subcrónico

El número de réplicas para el blanco fueron tres y para el valor subcrónico cinco, 48 peces en total, distribuidos en depósitos de 30 litros con 18 peces para el blanco y 30 para la concentración subcrónica, cada replica con 6 peces, expuestos durante 21 días. El número de organismos y réplicas fue menor para el bioensayo subcrónico debido a que se ensayaron solo dos concentraciones 6.5 mg/l y el blanco.

3.3. Selección de las concentraciones

El tóxico atrazina es una sustancia química sólida y las soluciones fueron preparadas en p/v (mg/l); no fue necesario el uso de disolventes o dispersantes, pues la atrazina estaba al 80% con un 20 % de un ingrediente inerte que cumplía la función de agente dispersante. Por lo tanto es importante destacar que la CL_{50} y el valor crónico fueron determinados para la materia total, debido a que la mayoría de las marcas comerciales manejan la atrazina con un porcentaje de ingredientes inertes.

Para determinar las concentraciones del herbicida Atrazina: 2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-1,3,5-triazina y establecer estadísticamente la CL_{50} . Se emplearon pruebas piloto de toxicidad a corto plazo (48 hrs), exponiendo a los organismos a una amplia gama de concentraciones en proporciones logarítmicas (0, 0.1, 1, 10 y 100 mg/l), se observó que debajo de 1 mg/l los peces no presentaban afectación y por arriba de 10 morían un porcentaje de peces mayor al 50 %; así que se eligieron las concentraciones altas que generarían mayor mortalidad, siendo 12, 14, 18, 20 y 22 en mg/l, estos valores se multiplicaron por el factor 0.5 siguiendo una serie geométrica de valores para obtener concentraciones espaciadas y así obtener el rango idóneo para la determinación de la CL_{50} , estas fueron posteriormente 0, 3, 6, 7, 9, 10 y 12 en ppm (mg/l). La concentración del tóxico para el ensayo subcrónico fue determinada durante

el desarrollo y análisis del bioensayo agudo, mediante un análisis estadístico de varianza.

3.4. Realización del bioensayo agudo

El bioensayo agudo con la especie *Oreochromis niloticus*, se realizó de acuerdo a los métodos de prueba de toxicidad para organismos acuáticos, de la sección 8010 A.1 a la sección 8010 F.3 y de los procedimientos de prueba de toxicidad para peces de la sección 8910 A.1 a la sección 8910.C.2.b, del APHA (1992). Para evaluar la tolerancia de la especie se ensayaron el blanco y seis concentraciones del herbicida Atrazina (0, 3, 6, 7, 9, 10 y 12 mg/l).

Para iniciar el bioensayo se prepararon 21 depósitos, cada uno inicialmente con 20 litros de agua e inmediatamente se agregó la solución del tóxico, posteriormente se aforó cada depósito a 30 litros para que tuvieran su concentración respectiva (3, 6, 7, 9, 10 o 12 mg/l) y se dispersaron las sustancias mediante agitación.

Se dejó de alimentar a los peces 48 hrs antes del bioensayo agudo, esto reduce al mínimo el empobrecimiento del oxígeno, acumulación de residuos metabólicos y el estrés inducido por apiñamiento (APHA, 1992). Los 126 organismos aclimatados se distribuyeron equitativamente en los 21 depósitos con ayuda de una red. La prueba de toxicidad aguda fue de duración corta (72 hrs) y estático, las soluciones y los peces se colocaron y se mantuvieron en los depósitos durante todo el ensayo. Una vez aplicado el tóxico se realizaron observaciones de los organismos a los 30 min, después cada 2 hrs hasta las 12 hrs de haber iniciado el bioensayo, los siguientes dos días se realizaran siete observaciones durante el día hasta completar 72 hrs.

Mientras se realizaban las observaciones se cuantificaban las muertes por replica de cada concentración, tomando como organismos muertos a aquellos sin movilidad, ubicados en el fondo de los depósitos y acostados horizontalmente, especialmente si no existía movimiento en el opérculo branquial y aleta caudal.

3.4.1 Determinación de la Concentración Letal Media (CL₅₀) por el Método Probit

El método Probit, también conocido como “Método de Unidades Probabilísticas” es utilizado para evaluar la relación dosis respuesta de un contaminante sobre un organismo, medida en términos de la concentración letal media (CL₅₀) y su precisión o intervalo de confianza (NMX-AA-087-1995).

Para calcular la CL₅₀ primero se organizaron los datos obtenidos experimentalmente durante el bioensayo de 72 horas, (Tabla 19) y se prepara una tabla con los siguientes datos:

- Concentración del efluente usado en la prueba (%)
- Logro de la concentración de efluente (X)
- Número de organismos por concentración (N)
- Mortalidad observada por concentración (r)
- Porcentaje de mortalidad por concentración (P)
- Probit empírico (Pr)
- Probit calculado (PC)

Seguidamente se calculó el valor del Probit Empírico (Pr) relacionando el porcentaje de mortalidad de cada concentración con los valores correspondientes de la Tabla 20.

Se grafica el Log₁₀ de las concentraciones en el eje “X” y los Probit empíricos en el eje “Y” seguidamente se efectúa el ajuste de la recta por el “método de mínimos cuadrados”, utilizando la ecuación de la recta $Y = mx+b$

Una vez finalizado esto, se traza una recta perpendicular al eje “Y” exactamente en el valor de Probit igual a 5. En el punto de intersección con la recta ajustada, se proyecta hacia el eje “X” para obtener el Log₁₀ de la CL₅₀, para obtener un número más exacto es recomendable sustituir en la ecuación de la recta los valores correspondientes a “m” y “b” e igualar Y a 5, para despejar X.

Para poder obtener el Probit calculado de cada una de las concentraciones se sustituye el valor de \log_{10} de cada concentración en la ecuación de la recta.

Una vez obtenido el valor de \log_{10} de la CL_{50} , para determinar la CL_{50} es necesario aplicar Antilog_{10} de X para obtener la concentración buscada en mg/l

Con ayuda del Programa Microsoft Excel 2007 se graficaron los valores del Probit empírico y Probit calculado con los valores logarítmicos de las concentraciones.

3.4.2 Determinación del Error patrón.

Primero se determinó "S", que está definido como el intervalo de incremento de \log_{10} de la concentración (X) por unidad de incremento en el Probit Calculado (PC) y tiene la siguiente relación:

Se determinó **S** mediante la siguiente relación

$$S = \frac{X_2 - X_1}{PC_{Max} - PC_{Min}} \quad (1)$$

Donde:

X_2 = Es el valor más bajo obtenido de la concentración en $\log(x)$

X_1 = Es el valor más alto obtenido a partir de la concentración en $\log(x)$.

PC min = Es el valor más bajo de Probit Calculado

PC max = Es el valor más bajo de Probit calculado

Para determinar el error patrón del $\log_{10} CL_{50}$, fué necesario preparar una tabla con los siguientes datos:

- Logaritmo de la concentración (X)
- Número de organismos en cada concentración (Nn)
- Probit calculado (PC)

- Factor ponderado (w)
- Valores de Probit calculado (CP)
- Productos : Nw, NwX y NwX²
- Sumatorias : Nw, NwX y NwX²

Después es necesario encontrar en la Tabla 21 el factor ponderado W de acuerdo al Probit calculado para cada concentración

Una vez obtenido el factor ponderado (w) y calculados los productos: Nw, NwX, NwX² y sumatorias que se sustituyen en esta ecuación:

$$ES \log CL_{50} = S^2 \left[\left(\frac{1}{\sum Nw} \right) + \left(\frac{\sum Nw(m-z)^2}{\sum Nw(\sum NwX)^2 - \sum (NwX)^2} \right) \right]^{0.5} \quad (2)$$

Donde:

ES= Error estándar

S= Intervalo de Incremento = 0.09311854

m = pendiente obtenida por mínimos cuadrados = 10.739

Nw = 43.0992

NwX = 41.26607829

(NwX)² = 385.4157208

Para calcular él valor de z se usó la siguiente fórmula:

$$Z = \frac{NwX}{Nw} \quad (3)$$

Finalmente para determinar el intervalo de confianza se sustituyen los valores correspondientes en la siguiente relación:

$$IC CL_{50} = (CL_{50}) (ESLog_{10}CL_{50}) (\log_{10}) \quad (4)$$

3.5. Realización del ensayo subcrónico

La metodología se basó sobre el balance energético de *Ctenopharyngodon idella* (Espina 1986), del Manual de métodos para la evaluación del balance energético en crustáceos del laboratorio de ecología y biología marina experimental de la Facultad de Ciencias de la UNAM (Rosas *et al.* 2003) y de los procedimientos de prueba de toxicidad para peces del APHA (1992).

Una vez concluido el ensayo agudo se realizó un análisis de varianza y se determinó la máxima concentración de efectos no observables (CENO), y la mínima concentración de efectos observables (CEM) y no se encontraron diferencias estadísticas significativas con respecto al blanco. En esta fase del estudio, se utilizó la concentración que representa el valor crónico 6.5 mg/l, es decir, la media geométrica entre la CENO y la CEM (APHA, 1992), siendo la concentración subcrónica a la que fueron sometidos los peces, mayor a la CENO y menor a la CEM (CENO < VC < CEM).

El término de flujo para la prueba fue de renovación o semiestática, cada 72 hrs los peces eran expuestos a las soluciones frescas de igual concentración (6.5 mg/l), salvo por las replicas del blanco, esto se llevó a cabo remplazando las soluciones. Durante el período de 21 días se alimentó a los peces una vez al día con alimento de la marca comercial NUTRIPAC® al 8% de su peso corporal, permitiéndoles comer durante tres horas, posteriormente se recolectaba el alimento remanente mediante un sifón de 10 mm de grosor y se depositaba el alimento en una maya fina para filtrar agua en un depósito de 10 litros.

La recolección de heces se realizaba posterior a la recolección de alimento utilizándose pinzas permitiendo obtener las heces completas y limpias. La cantidad de alimento consumido se determinó restando al peso del alimento suministrado el peso

del alimento remanente, posteriormente se realizaron los análisis gravimétricos y se obtuvieron los pesos del alimento consumido estableciendo una proporción con el alimento remanente.

3.5.1 Análisis gravimétrico

Al final del bioensayo subcrónico se analizaron las muestras representativas de las heces evacuadas y del alimento. Se determinó la tasa de ingestión (I), a partir del alimento suministrado durante 21 días y el peso vivo promedio de los peces como se describe en los resultados. El alimento suministrado, las heces y los peces se analizaron, y se obtuvo el peso seco (PS), peso de las cenizas (C) y contenido de materia orgánica (PSLC), para establecer una comparación entre el blanco y el valor crónico.

Con el fin de no conseguir pesos erróneos se lavaron las capsulas de porcelana, se mantuvieron en una solución de HCl 1 N durante 24 hrs y se pusieron a secar durante 48 hrs. En las cápsulas y crisoles limpios y secos se realizaron las siguientes determinaciones.

Peso vivo (PV): Para calcularlo se sacrificaron los organismos y se dejaron secar durante cinco minutos para eliminar el exceso de humedad posteriormente se pesó la muestra en una balanza con una aproximación de 0.0001 gr de exactitud.

Peso seco (PS): Para determinarlo se colocó el equivalente en peso del alimento consumido (muestras de heces recolectadas) y los peces por cada réplica y concentración en cápsulas de porcelana limpias, sometidas a ignición y pesadas. Las muestras se secaron en una estufa a 60°C durante 48 hrs, se dejaron enfriar en un desecador y posteriormente se pesaron en una balanza analítica marca Sartorius modelo LA 2305.

Cenizas (C): Se colocaron las muestras de PS en un crisol, seguidamente se llevaron a ignición a 550°C durante 6 horas. Se enfrió cada muestra en el desecador, se pesó y se realizó la diferencia de pesos con respecto al crisol.

Materia orgánica o peso seco libre de cenizas (PSLC): Se calculó el PSLC restando el peso de las cenizas al peso seco de la muestra obtenidos previamente.

3.5.2 Determinación del campo de crecimiento

Se obtuvo la proporción entre el PSLC y PS del alimento y las heces con las fórmulas 5 y 6.

$$F' = \frac{\text{PSLC Alimento}}{\text{PS}} \quad (5)$$

$$E' = \frac{\text{PSLC Heces}}{\text{PS}} \quad (6)$$

La eficiencia de asimilación U' se calculó acorde con la ecuación proporcionada por Conover (1966):

$$U' = \frac{F' - E'}{(1 - E')F'} \quad (7)$$

La eficiencia de asimilación corregida por la absorción de minerales se calculó con la siguiente fórmula en %

$$U^* = U' / 100 + \left[(A_u / A_f) E' (1 - F') / F' (1 - E') \right] \quad (8)$$

Donde:

U^* = Eficiencia de asimilación corregida

U' = Eficiencia de asimilación

A_u = C/PS alimento

A_f = C/PS heces

F' = PSLC/PS alimento

E' = PSLC/PS heces

A en gr / gr PV /día se calculó del producto de la tasa de ingestión por la eficiencia de asimilación corregida:

$$A = I \cdot U^* \quad (9)$$

Donde:

A = Asimilación

I = Ingestión

U = Eficiencia de asimilación corregida

Para llevar a cabo las mediciones de oxígeno (**R**), los depósitos se llenaron completamente con la solución de concentración 6.5 mg/l, se suspendió la aireación, se sellaron con una lámina de plástico. Se tomó una muestra inicial y al cabo de dos horas se tomó la muestra final del agua de cada depósito. En todas las muestras se cuantificó la concentración de oxígeno. El gas consumido por los organismos se obtuvo de la diferencia entre la concentración de oxígeno de las muestras iniciales y finales. Los datos se expresaron, por réplica, en g O₂/día/g PV.

El nitrógeno amoniacal (**U**) se midió de las mismas muestras empleadas para cuantificar la concentración de oxígeno, mediante el espectrofotómetro HACH (R – 2010). La tasa de excreción se expreso en g N-NH₃/g PV /día.

El campo de crecimiento (**P**) se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$P = A - (R + U) \quad (10)$$

Donde:

P = Potencial de crecimiento

A = Asimilación

R = Respiración

U = Excreción nitrogenada

3.6 Métodos Estadísticos

Para determinar la CL_{50} con un intervalo de confianza del 95%, se utilizó como criterio de mortandad, la inmovilidad de los peces de la especie *Oreochromis niloticus* expuesta al herbicida durante 72 hrs, el bioensayo se realizó de acuerdo al procedimiento de la **NMX-AA-087-1995**, la cual establece el método para el análisis biológico de calidad del agua mediante pruebas de toxicidad aguda utilizando al cladóceros dulceacuícola *Daphnia magna* Stratus 1820.

Para analizar las diferencias de la variable muertos entre las concentraciones del herbicida en el bioensayo de toxicidad aguda, se aplicó la estadística inferencial del análisis de varianza (ANOVA) de una vía. También se determinó mediante el ANOVA entre los controles y las concentraciones de menor número de muertos, la mínima concentración de efectos observables (CEM) y la máxima concentración de efectos no observables (CENO), elegidas de acuerdo a las diferencias significativas. Para el bioensayo crónico se aplicó la prueba de T. Student, con el fin de determinar si existían diferencias en el campo de crecimiento entre el valor crónico y los controles. Las ANOVAS se realizaron con un nivel de confianza de 95 % y para este nivel de confianza se rechaza o se acepta la hipótesis estadística, es decir, la hipótesis nula. Así se plantearon las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula= La mortalidad evaluada entre las concentraciones, no presenta diferencias estadísticas significativas.
- Hipótesis alterna= Existen diferencias significativas en la mortalidad de las concentraciones.

- Hipótesis nula= El campo de crecimiento evaluado entre el control y el valor crónico, no presenta diferencias estadísticas significativas,
- Hipótesis alterna= Existen diferencias significativas para el campo de crecimiento entre el control y el valor crónico.

Con el fin de conocer la relación entre la concentración subcrónica y crecimiento de *Oreochromis niloticus*, se realizó un análisis de correlación y se calculó el coeficiente de correlación entre las replicas de concentración y el campo de crecimiento relativo (P1) y total (P3), durante el bioensayo subcrónico de toxicidad.

Los cálculos estadísticos y gráficos se realizaron con el programa Excel 2007 y el paquete Statistica 8 y JMP ® versión 8.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

4.1 Ensayo Agudo

4.1.1 Parámetros Fisicoquímicos

A inicio y término del bioensayo se registraron en cada una de las réplicas del grupo control y experimentales los siguientes parámetros: pH, temperatura, y oxígeno disuelto. Los valores promedios de oxígeno disuelto fueron de 7.67 ± 0.126 , el pH fue de 8.1506 ± 0.032 y la temperatura de 25.65 ± 0.228 (Tabla 18)

4.1.2 Calculo de la CL₅₀

Al finalizar las pruebas de toxicidad aguda, se obtuvieron los siguientes datos que se ordenaron en la Tabla 1, donde se observa que el mayor porcentaje de mortalidad se obtuvo con la concentración de 12 mg/l, el 61 % de mortandad fue con 9 y el menor porcentaje con 6 mg/l.

Tabla 1. Resultados finales obtenidos del bioensayo agudo con *Oreochromis niloticus*.

Concentración en mg/l	No. organismos expuestos por concentración	No. Organismos muertos por concentración	% mortalidad por concentración
0	18	0	0
3	18	0	0
6	18	1	5.55
7	18	4	22.22
9	18	11	61.11
10	18	12	66.66
12	18	17	94.44

Con los datos de cada concentración y sus correspondientes porcentajes de mortalidad por concentración de la Tabla 1 se elaboró la figura 2, donde podemos

observar que a cada concentración de herbicida le corresponde un valor creciente de mortalidad expresada en porcentaje. Cabe señalar que hasta la concentración de 3 mg/l no se presentó mortalidad sin embargo en 6 mg/l se observa un incremento significativo.

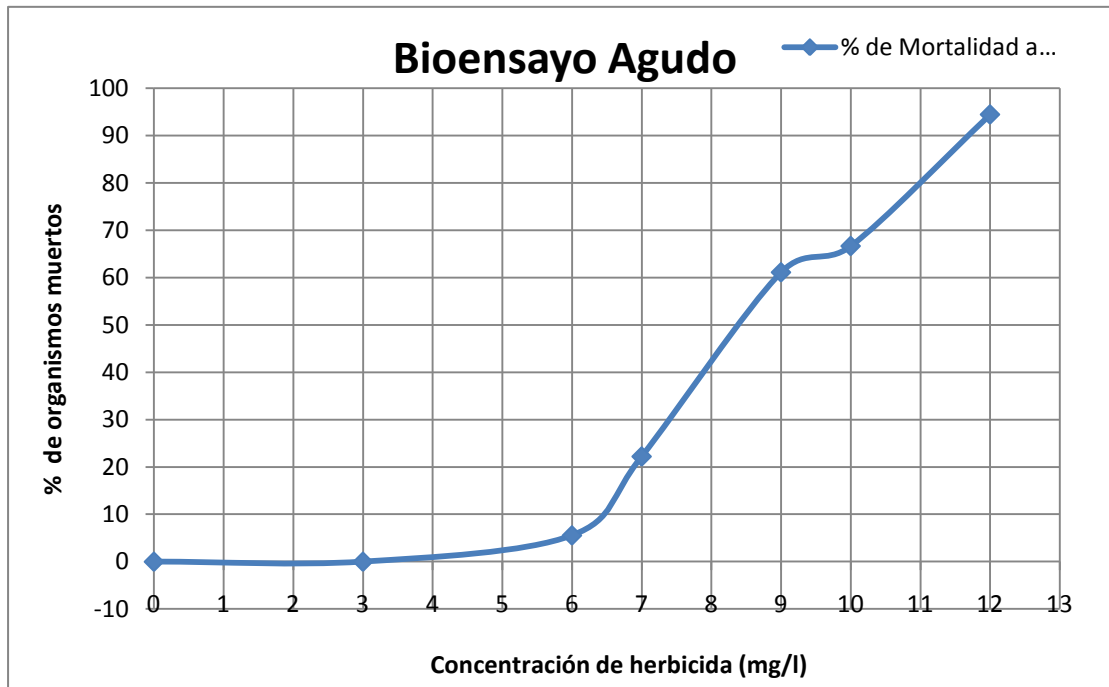


Figura 2. Comportamiento del porcentaje de mortalidad en las diversas concentraciones del bioensayo agudo

Se obtuvieron de la tabla 20 los valores de Probit empírico, pero debido a los decimales en los porcentajes de mortalidad fue necesario realizar interpolaciones. Se registraron los valores de Probit empírico en la Tabla 2.

Mediante el método de los mínimos cuadrados se obtuvo un ajuste lineal con su respectiva ecuación. La ecuación de la recta, tiene valor de la pendiente $m=10.739$ y la ordenada al origen $b = 5.0305$ respectivamente, con una r^2 de 0.9949 (Figura 3).

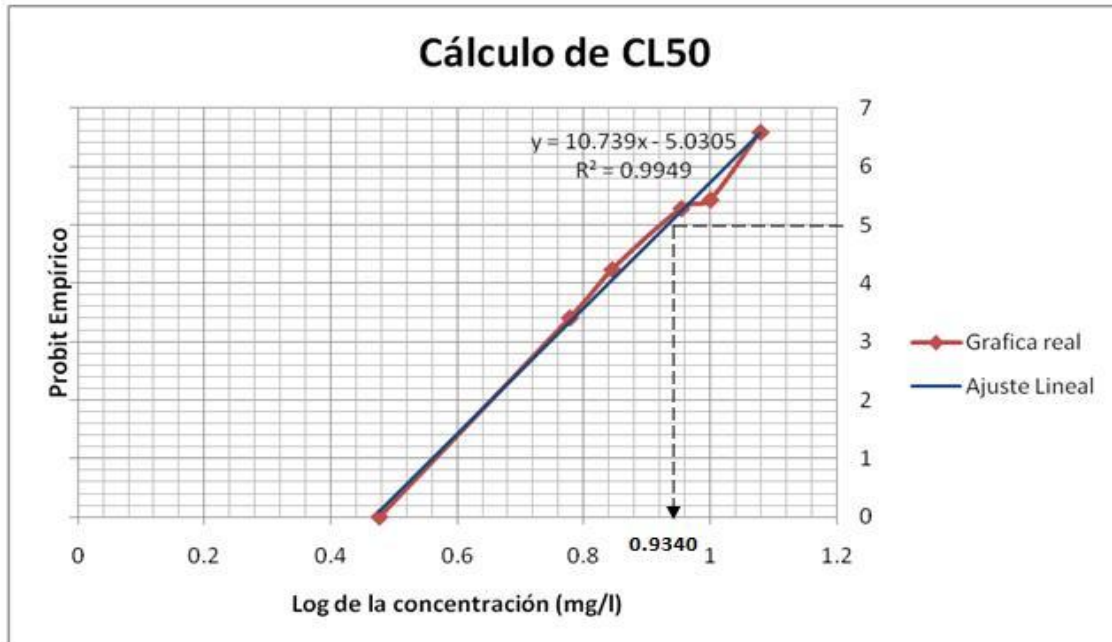


Figura 3. Determinación de la CL₅₀ por el método Probit.

Siguiendo con la metodología del cálculo de CL₅₀ por el método Probit, se encontró gráficamente el valor de la concentración de atrazina en escala logarítmica que corresponde al valor de 5 unidades del Probit empírico. Para mayor exactitud se despejó x de la ecuación de la recta, quedando la siguiente expresión

$$X = (5 + 5.0305) / 10.139$$

Resultando que X fue de 0.9340 se aplicó el Antilog₁₀ y se obtuvo que la **CL₅₀ = 8.590 mg/L**

Después de calcular todos los valores del Probit calculado, éstos se ordenaron en la Tabla 2 donde se puede observar que el Probit empírico y el Probit calculado no varían más de 5 % entre ellos, por lo que podemos constatar que en escala logarítmica el arreglo lineal fue muy aproximado.

Tabla 2. Datos de toxicidad de *Oreochromis niloticus* para el Método Probit.

Concentración (mg/l)	Log de [c] (x)	# de organismos (N)	Mortalidad observada (r)	% de mortalidad	Probit Empírico (Pr)	Probit Calculado (PC)
0	0	18	0	0	0	0
3	0.4771	18	0	0	0	0.0933
6	0.7781	18	1	5.55	3.4095	3.3260
7	0.8450	18	4	22.22	4.2366	4.0450
9	0.9542	18	11	61.11	5.2833	5.2171
10	1	18	12	66.66	5.4298	5.7085
12	1.0791	18	17	94.44	6.5896	6.5588

4.1.3 Error Patrón

Sustituyendo en las formulas 1 y 3:

$$S = \frac{1.0791812 - 0.4771213}{6.558827401 - 0.093305154}$$

$$S = \frac{2.261859507}{70.29437378} = 0.09311854$$

$$Z = \frac{41.26607829}{43.0992} = 0.957467384$$

Tabla 3. Datos de toxicidad para el cálculo del Error Patrón

Log de la Concentración (X)	# de organismos (N)	Probit Calculado (PC)	Factor Ponderado (w)	Producto (Nw)	Producto (NwX)	Producto (NwX) ²
	18					
0.4771213	18	0.093305154	0	0	0	
0.7781513	18	3.326066278	0.2158	3.8844	3.022650717	9.136417357
0.845098	18	4.045007852	0.4534	8.1612	6.897014124	47.56880383
0.9542425	18	5.217110309	0.626	11.268	10.7524046	115.6142046
1	18	5.7085	0.532	9.576	9.576	91.699776
1.0791812	18	6.558827401	0.5672	10.2096	11.01800885	121.396519
Sumatorias				43.0992	41.26607829	385.4157208

Sustituyendo en fórmula 2:

$$ES \log CL_{50} = 0.00867106 [0.0230228 + 0.25414328]^{0.5}$$

$$ES \log CL_{50} = 0.008671(0.526367)$$

$$ES \log CL_{50} = 0.0045641601$$

Sustituyendo en fórmula 4:

$$IC CL_{50} = (8.5902) (0,0045641601) (2.3025) = 0.090277$$

La CL_{50} con 95 % de confiabilidad estadística y su intervalo de confianza es:

$$CL_{50} = 8.5902 \pm 0.090277 \text{ mg/L}$$

4.1.4 Resultados del análisis Estadístico

La estadística descriptiva de los resultados de mortalidad en el bioensayo agudo con *Oreochromis niloticus*, está representada por valores de posición: percentil 25, 50 y 75; centralización: media, mediana y moda; y de dispersión: varianza, desviación estándar y error estándar (Tabla 4).

Tabla 4. Estadística descriptiva de la variable muertos para el bioensayo agudo.

Número de valores	Media	Límite de confiabilidad inferior - 95.000%	Límite de confiabilidad superior 95.000%	Mediana	Moda		
21	2.142	1.112008	3.173707	1	0		
Mínimo	Máximo	Varianza	Desv. Std.	Error estándar	Percentiles		
					25	50	75
0	6	5.128571	2.264635	0.4941	0	1	4

Se realizó los análisis de la estadística descriptiva conforme la variable muertos para determinar si presentaba una distribución normal (Fig.19). Mediante el método estadístico de Kolmogorov-Smirnov se obtuvieron los resultados $d= 0.2169086$ y $0.05 < p < 0.20$, demostrando que la variable muertos presenta una distribución normal.

Para verificar que los valores tienen una distribución normal, se obtuvieron para la variable muertos conforme a las concentraciones de la atrazina, valores esperados de normalidad dentro de la elipse de confianza del 95 %.(Fig.20 y Fig. 21).

Al aplicar el análisis de varianza se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis de varianza de la variable muertos.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	93.9047619	6	15.650793	25.2820	9.49318E-07	2.8477259
Dentro de los grupos	8.66666666	14	0.6190476			
Total	102.571428	20				

Los resultados del análisis de varianza, $F = 25.28205128 > \text{Valor crítico para } F = 2.847725996$ y valor de probabilidad = $0.000000943318 < \text{valor crítico de probabilidad} = 0.05$ (Tabla 5), lo cual indica que se tiene evidencia suficiente para suponer que existen diferencias significativas en la variable muertos de las diferentes concentraciones (Fig. 4).

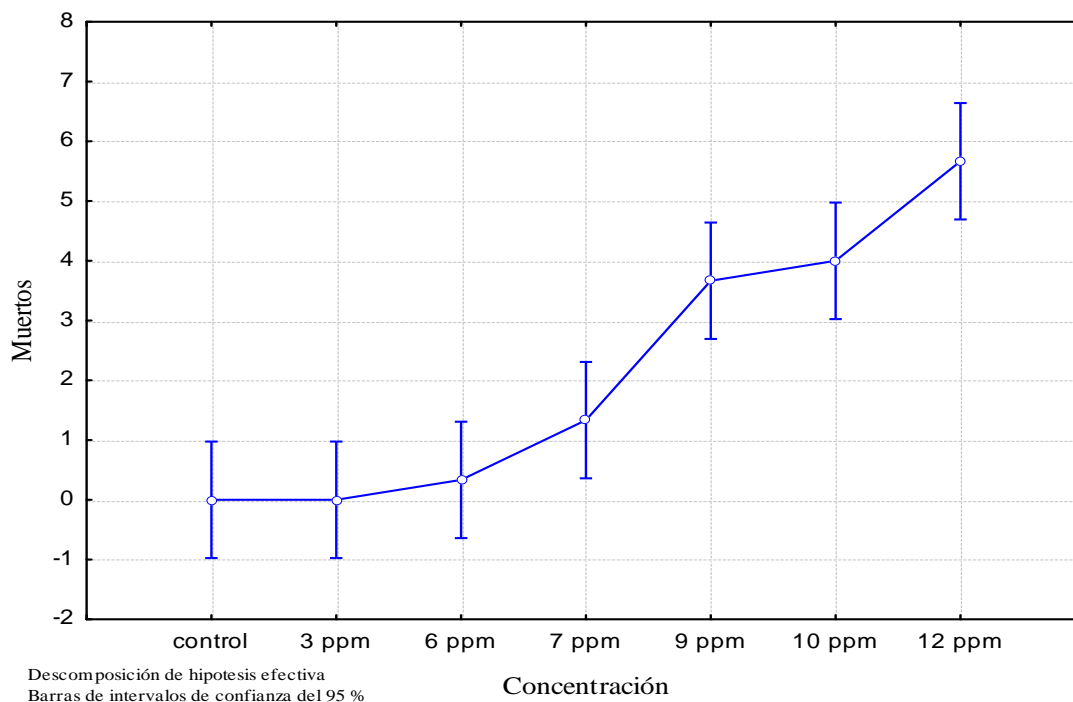


Figura 4. Promedio de la variable muertos por concentración de atrazina.

Al encontrar que existen diferencias significativas en la variable muertos de las diferentes concentraciones, se procedió a realizar un análisis de varianza entre el control y las concentraciones 6 y 7 ppm (Tabla 6 y Tabla 7) debido a que eran las concentraciones con menor número de muertos.

Tabla 6. Resultados del análisis de varianza del control y 6 ppm.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.222222	2	0.11111111	1	0.421875	5.143252
Dentro de los grupos	0.666666	6	0.11111111			
Total	0.888888	8				

Tabla 7. Resultados del análisis de varianza para el control y 7 ppm.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3.555555	2	1.777777	16	0.00393643	5.1432528
Dentro de los grupos	0.666666	6	0.111111			
Total	4.222222	8				

Los resultados del análisis de varianza, $F= 1 < \text{Valor crítico para } F= 5.14325285$ y valor de probabilidad = $0.421875 > \text{valor crítico de probabilidad}= 0.05$, indican que no existen diferencias significativas en la variable muertos de las concentraciones 0 y 6 ppm, por lo tanto 6 ppm es la máxima concentración de efectos no observables (CENO) (Fig. 5).

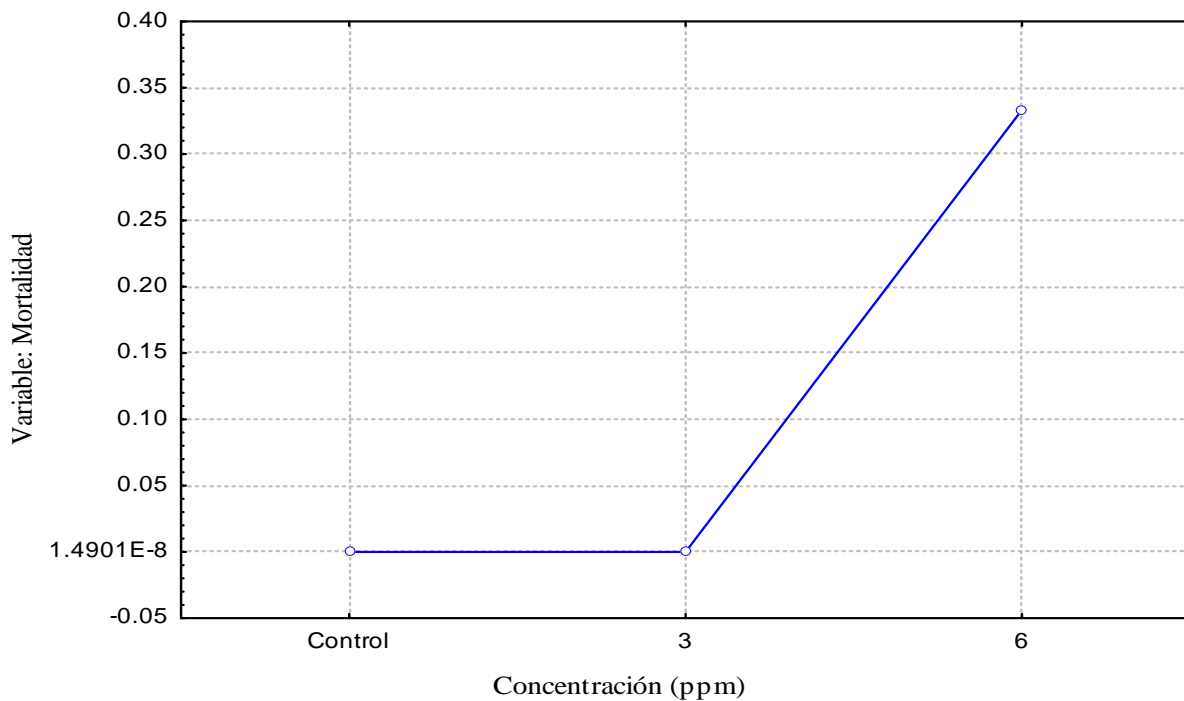


Figura 5. Promedio de Mortalidad en concentraciones de efectos no observables

Los resultados del análisis de varianza, $F= 16 > \text{Valor crítico para } F= 5.14325285$ y valor de probabilidad = $0.003936434 < \text{valor crítico de probabilidad}= 0.05$, indican que existen diferencias significativas en la variable muertos de las concentraciones 0 y 7 ppm, por lo tanto 7 ppm es la mínima concentración de efectos observables (CEM) (Fig. 6).

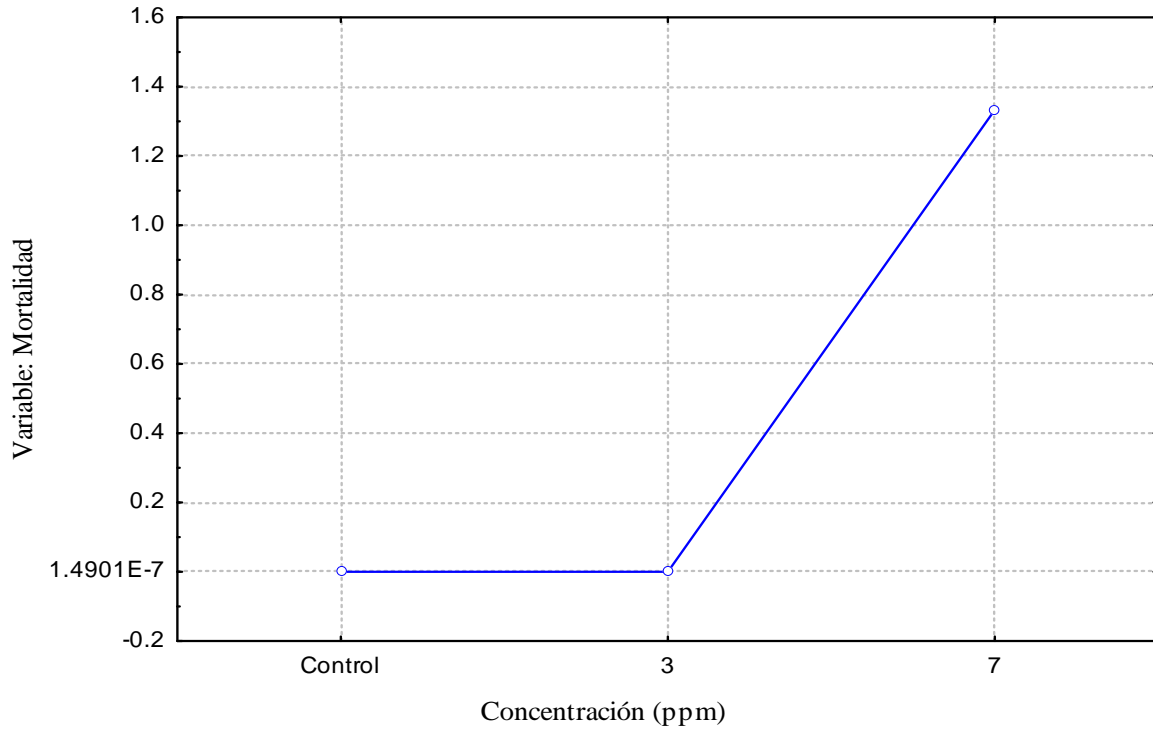


Figura 6. Promedio de Mortalidad en concentraciones de efectos observables

También se aplicó un análisis de varianza a las réplicas de las concentraciones divididas en tres grupos cada uno con las siete concentraciones ensayadas (Fig. 20) se obtuvo un factor de corrección $F = 0.101 < \text{Valor crítico para } F = 3.554$ y valor de probabilidad = $0.904 > \text{valor crítico de probabilidad} = 0.05$ (Fig. 7), lo que significa que no existen diferencias significativas en la variable muertos de las tres réplicas con diferentes concentraciones.

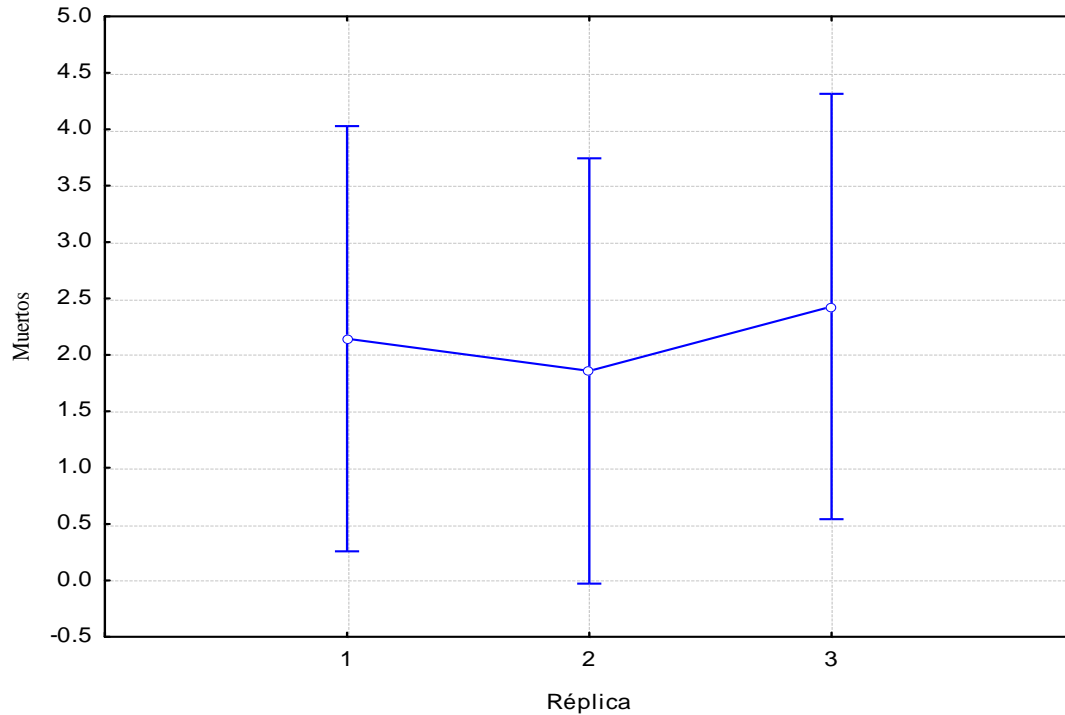


Figura 7. Promedio de la variable muertos para los grupos de réplicas.

4.2 Ensayo subcrónico.

4.2.1 Parámetros fisicoquímicos

Se puede observar que las características fisicoquímicas del agua, tanto en las cámaras experimentales como en el control, no presentaron variaciones mayores del 1% durante los 21 días que duró el bioensayo. En promedio la temperatura se mantuvo constante a 29.50 °C. La permanente aireación permitió un promedio de concentraciones de oxígeno entre 5.17 y 6.86 mg/l. El pH en promedio fue de 7.93 mg/l. Siendo estas condiciones óptimas para la supervivencia de la especie (Tabla 23).

4.2.2 Resultados del análisis gravimétrico

Los resultados del análisis gravimétrico como promedio de las muestras de peces por concentración se muestran en la Tabla 8. Se pudo observar que en general las réplicas del control tienen mayor PV y por ende mayor PS, PSLC y C. Así el promedio del PV para los controles es 28.58 g, de PS=6.12 g, PSLC=5.11 g y C=1.01 g; siendo un 43.63, 40.88, 39.92 y 46.53 % respectivamente mayores, comparadas con el promedio de las réplicas de la concentración crónica que tienen como resultado en PV= 16.11, PS= 3.618, PSLC =3.07 y C =0.54.

Tabla 8. Resultados obtenidos de las muestras de *Oreochromis niloticus*; peso húmedo (PV), peso seco (PS), peso seco libre de cenizas (PSLC) y cenizas (C).

Concentración Atrazina (mg/l)	PV(g)	P S(g)	PSLC(g)	C(g)
Control 1	30.8400	5.9960	4.9451	1.0509
Control 2	25.7554	5.9106	4.9854	0.9252
Control 3	29.1695	6.4756	5.4145	1.0611
Réplica 1 6.5	17.0039	3.9231	3.3338	0.5893
Réplica 2 6.5	18.7392	4.2765	3.6012	0.6753
Réplica 3 6.5	16.4124	3.8637	3.3657	0.498
Réplica 4 6.5	14.0711	3.1228	2.6539	0.4689
Réplica 5 6.5	14.3413	2.9259	2.4157	0.5102

4.2.3 Resultados del Campo de crecimiento

El alimento recuperado representaba un porcentaje del alimento no ingerido, se realizó un análisis gravimétrico de éste y un arreglo proporcional para obtener el equivalente del alimento consumido durante 21 días (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados del Alimento ofrecido (A), Alimento recuperado (B y C) y Alimento consumido (A-C) durante 21 días en el ensayo subcrónico con *Oreochromis niloticus*.

Concentración Atrazina (mg/l)	A (g)	B(g)	C(g)*	A-C (g/tanque)
Control 1	105	26.1258	49.7508	55.2492
Control 2	105	30.5610	54.186	50.815
Control 3	105	21.9712	45.595	59.405
Réplica 1 6.5	105	49.9259	73.5509	31.4491
Réplica 2 6.5	105	54.2741	77.8991	27.1009
Réplica 3 6.5	105	43.2650	66.89	38.11
Réplica 4 6.5	105	59.3862	83.0112	21.9888
Réplica 5 6.5	105	53.3513	76.9763	28.0237

*. C fue calculado considerando que 22.5% del alimento ofrecido se perdió por lixiviación. Así $C = (A * 0.225) + B$. (Rosas, 2003).

Con la cantidad de alimento ingerido por depósito se estimó la ingestión por cada organismo en proporción con el peso vivo promedio (PV) o peso húmedo (PH), de cada depósito y a su vez entre los 21 días transcurridos del bioensayo subcrónico (Tabla10). Los controles presentaron mayor consumo de alimento por depósito y por organismo, pero al establecer la proporción del alimento consumido con el PV y días por cada depósito (control o concentración subcrónica), se obtuvo en general una mayor ingestión para los controles, salvo por la réplica 3 que fue mayor a las tres réplicas del control y en un 20 % al promedio de los mismos.

Tabla 10. Tasa de ingestión (I) durante 21 días en el bioensayo subcrónico con *Oreochromis niloticus*.

Concentración (mg/l)	Número de organismos	INGESTIÓN(I)		Peso Vivo (g)	I (gg ⁻¹ PV)	I (g/g PV/día)
		I(g/deposito)	I(g/organismo)			
Control 1	6	55.2492	9.2082	30.8400	0.2985	0.0142
Control 2	6	50.815	8.4691	25.7554	0.3288	0.0156
Control 3	6	59.405	9.9008	29.1695	0.3394	0.0161
Réplica 1 6.5	6	31.4491	5.2415	17.0039	0.2758	0.0131
Réplica 2 6.5	6	27.1009	4.5168	18.7392	0.2410	0.0114
Réplica 3 6.5	6	38.11	6.3516	16.4124	0.3870	0.0184
Réplica 4 6.5	6	21.9888	3.6648	14.0711	0.2604	0.0124
Réplica 5 6.5	6	28.0237	4.6706	14.3413	0.3256	0.0155

Se hizo el análisis del alimento remanente, posteriormente se realizaron los análisis gravimétricos y se obtuvieron los pesos del alimento consumido estableciendo una proporción con el alimento remanente, para obtener PSLC, PS y C del alimento y de las heces en gramos. Los resultados fueron utilizados para obtener la proporción entre PSLC y PS, así como la proporción de C y PS, tanto para el alimento (F', Au) como para las heces (E', Af). Las proporciones Au y Af fueron utilizadas a su vez para obtener la cantidad de C existente en relación con su PS, dividida entre las C del alimento y de las heces, con el objetivo de obtener una variable para la eficiencia de asimilación (U') (Tabla 11).

Tabla 11. Resultados de la proporción de PSLC/PS (F´), C/PS (Au) del alimento; PSLC/PS (E´), C/PS(Af) de las heces y proporción de las cenizas / peso seco entre alimento y heces (Au/Af)

Concentración Atrazina mg/l	PS (g)	PSLC (g)	C (g)	PSLC/PS	C / PS	Cenizas de alimento/cenizas heces
Alimento				F´	Au	Au/Af
Control 1	55.2492	50.7724	4.4768	0.9189	0.0810	0.3393
Control 2	50.815	46.1125	4.7025	0.9074	0.09254	0.3792
Control3	59.405	54.5031	4.9019	0.9174	0.0825	0.4162
Réplica 1 6.5	31.4491	28.654	2.7951	0.9111	0.0888	0.3664
Réplica 2 6.5	27.1009	25.0095	2.0914	0.9228	0.0771	0.2932
Réplica 3 6.5	38.11	34.9287	3.1813	0.9165	0.0834	0.3260
Réplica 4 6.5	21.9888	20.1039	1.8849	0.9142	0.0857	0.2966
Réplica 5 6.5	28.0237	25.9264	2.0973	0.9251	0.0748	0.3694
Heces				E´	Af	
Control 1	0.5152	0.3922	0.123	0.7612	0.2387	
Control 2	0.3998	0.3022	0.0976	0.7558	0.2441	
Control3	0.4222	0.3385	0.0837	0.8017	0.1982	
Réplica 1 6.5	0.4064	0.3079	0.0985	0.7576	0.2423	
Réplica 2 6.5	0.2989	0.2203	0.0786	0.7370	0.2629	
Réplica 3 6.5	0.3217	0.2394	0.0823	0.7441	0.2558	
Réplica 4 6.5	0.2973	0.2114	0.0859	0.7110	0.2889	
Réplica 5 6.5	0.4027	0.3215	0.0812	0.7983	0.2016	

Con los valores de ingestión (I) obtenidos anteriormente, las proporciones entre materia orgánica y peso seco del alimento y heces (F', E'), como las proporciones de cenizas de los mismos (Au/Af), se procedió a calcular la eficiencia de absorción de la masa ingerida en el alimento (U') y la eficiencia de absorción corregida por la absorción de vitaminas y minerales (U*), por medio de las formulas 6 y 7, ordenando los valores en la tabla 12. Las diferencias encontradas para los promedios de U' son que el valor crónico (72.88%) presenta 4.92 % más eficiencia que el promedio de los controles (67.96 %) y para U* el valor crónico (81.95 %) es 1.77 % mayor que el promedio de los mismos (80.18 %).

Tabla 12. Obtención de la eficiencia de absorción de la masa ingerida en el alimento (U', %), y la eficiencia de absorción corregida por la absorción de vitaminas y minerales (U*, %) por medio de I, F', E' y Au/Af.

Concentración Atrazina mg/l	I (g/g PV/día)	F'	E'	Au/Af	U' (%)	U* (%)
Control 1	0.0142	0.9189	0.7612	0.3393	71.86693434	81.41248352
Control 2	0.0156	0.9074	0.7558	0.3792	68.41554119	80.39236797
Control3	0.0161	0.9174	0.8017	0.4162	63.59923751	78.74923486
Réplica 1 6.5	0.0131	0.9111	0.7576	0.3664	69.50398695	80.67772613
Réplica 2 6.5	0.0114	0.9228	0.737	0.2932	76.55655378	83.43017222
Réplica 3 6.5	0.0184	0.9165	0.7441	0.326	73.50798301	82.14438055
Réplica 4 6.5	0.0124	0.9142	0.711	0.2966	76.91032453	83.75872227
Réplica 5 6.5	0.0155	0.9251	0.7983	0.3694	67.95550972	79.79274443

La ingestión (I) y la eficiencia de absorción corregida por la absorción de vitaminas y minerales (U*) fueron los factores utilizados en la fórmula 8 para obtener como producto la asimilación (Tabla 13).

Tabla 13. Asimilación del alimento ingerido (A) por medio de la ingestión (I) y eficiencia de asimilación U*

Concentración Atrazina mg/l	Ingestión (I), (g/g pv/día)	Eficiencia de absorción corregida por la absorción de vitaminas y minerales (U*), (%)	Asimilación (A),(g/g pv/día)
Control 1	0.0142	81.41248352	0.011560573
Control 2	0.0156	80.39236797	0.012541209
Control3	0.0161	78.74923486	0.012678627
Réplica 1 6.5	0.0131	80.67772613	0.010568782
Réplica 2 6.5	0.0114	83.43017222	0.00951104
Réplica 3 6.5	0.0184	82.14438055	0.015114566
Réplica 4 6.5	0.0124	83.75872227	0.010386082
Réplica 5 6.5	0.0155	79.79274443	0.012367875

Las figuras 8, 9 y 10 demuestran la variación de la tasa de ingestión del control y la concentración subcrónica de acuerdo a sus réplicas. La ingestión (I), eficiencia de absorción (U*) y asimilación (A), fueron calculadas del promedio del peso de peso vivo de los organismos evaluados en cada réplica durante el bioensayo ecotoxicológico con atrazina, durante 21 días.

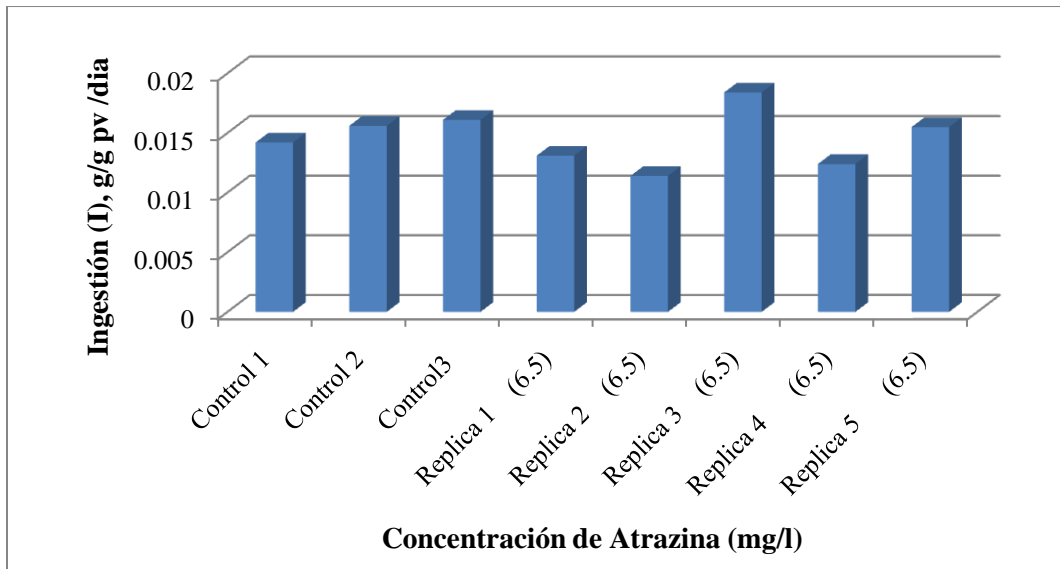


Figura 8. Tasa de ingestión de la especie *Oreochromis niloticus* durante 21 días en el bioensayo subcrónico.

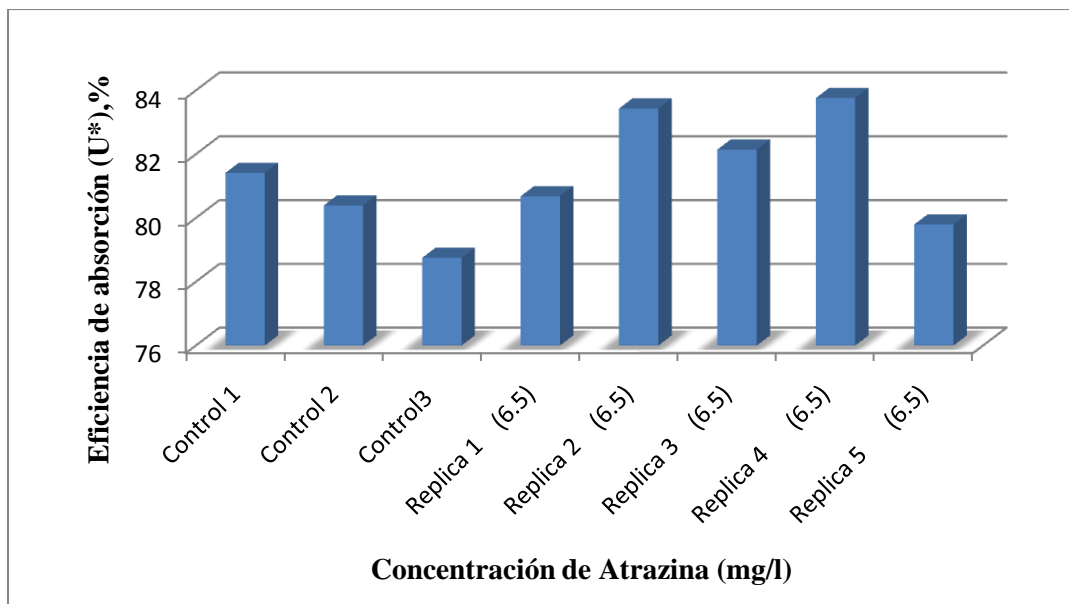


Figura 9. Eficiencia de asimilación de la especie *Oreochromis niloticus* durante 21 días en el bioensayo subcrónico.

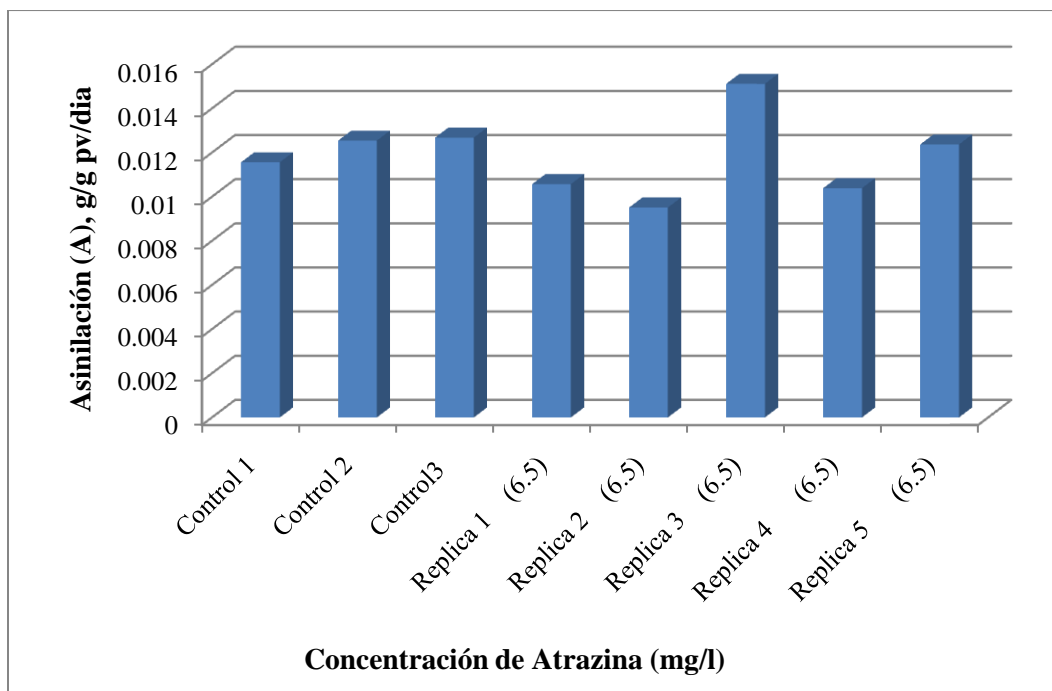


Figura 10. Asimilación de la especie *Oreochromis niloticus* durante 21 días en el bioensayo subcrónico.

Los datos obtenidos de ingestión (I), asimilación (A), excreción nitrogenada (U) y respiración (R) se integraron en la fórmula 9, para obtener la masa destinada al crecimiento en promedio de un organismo de la especie *Oreochromis niloticus* cuando es expuesto a concentraciones tóxicas de atrazina y por supuesto el control. Así se observa que la réplica 3 es la que supera a las réplicas del control con un valor de 0.0128337 mg/gPV/día (P1). Sin embargo para el campo de crecimiento únicamente expresado en gramos (P3) todos los valores del control son mayores a las réplicas de las concentraciones de 6.5 mg/l (Tabla 14). En general los controles presentan un campo de crecimiento para P1 24.85% más grande que el promedio de las réplicas de la concentración subcrónica. Si tomamos en cuenta solo la masa en gramos utilizada en promedio por cada réplica para el crecimiento a lo largo de 21 días, es decir, P3 obtenemos valores para el campo de crecimiento de los controles 56.6783 % más grandes que para las réplicas con 6.5 mg/l de concentración.

Tabla 14. Resultados del campo de crecimiento de *Oreochromis niloticus* (P1, P2, P3), por medio de ingestión (I), asimilación (A), respiración (R) y excreción nitrogenada (U)

Herbicida mg/l	I	A	R	U	P1 (g/gPV/día)	P2	P3 (g)
Control 1	0.0142	0.01156057	0.00022913	0.00024642	0.011085023	11.085023	7.179104296
Control 2	0.0156	0.01254121	0.0002899	0.00032614	0.011925169	11.925169	6.449887451
Control3	0.0161	0.01267863	0.00030625	0.00056223	0.011810147	11.810147	7.234417741
Réplica 1 concentración 6.5	0.0131	0.0105687	0.0002117	0.0003999	0.0099571	9.9571	3.555500186
Réplica 2 Concentración 6.5	0.0114	0.00951104	0.0003344	0.0003842	0.00879244	8.79244	3.918349855
Réplica 3 Concentración 6.5	0.0184	0.01511457	0.0002774	0.0004143	0.014422866	14.422866	4.970990765
Réplica 4 Concentración 6.5	0.0124	0.01032608	0.0034111	0.0002558	0.006659182	6.659182	1.967742333
Réplica 5 Concentración 6.5	0.0155	0.01236788	0.0017663	0.0003625	0.010239075	10.239075	3.083674572

El campo de crecimiento de *Oreochromis niloticus* puede ser expresada como g/g PV/ día (P1) tomando en cuenta el promedio del peso vivo (Fig. 11), pero también se puede expresar como el promedio de la masa alcanzada por cada organismo por concentración y réplica (Fig. 12).

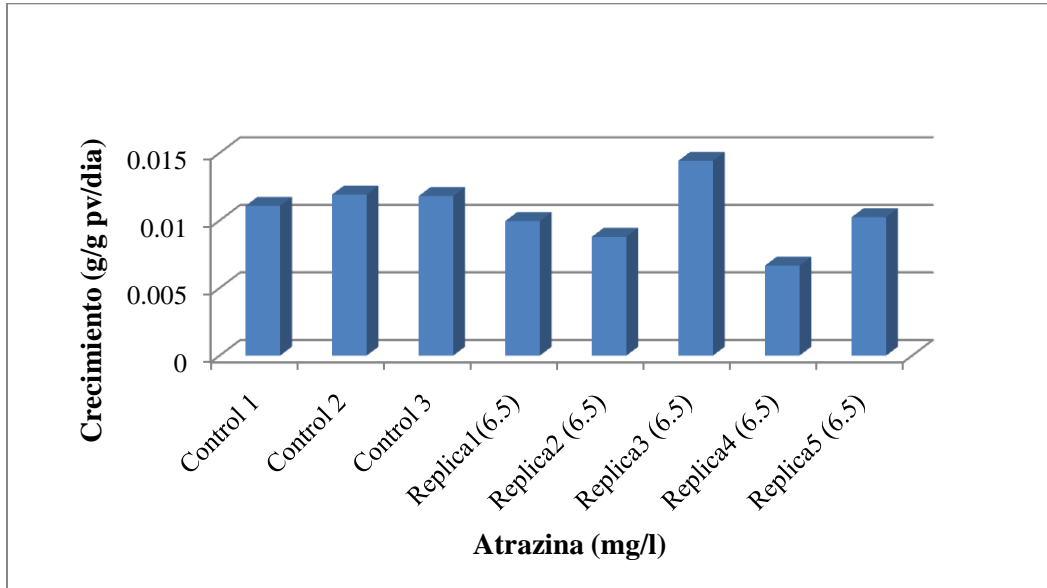


Figura 11. Crecimiento relativo por réplica de concentración durante el bioensayo subcrónico de toxicidad.

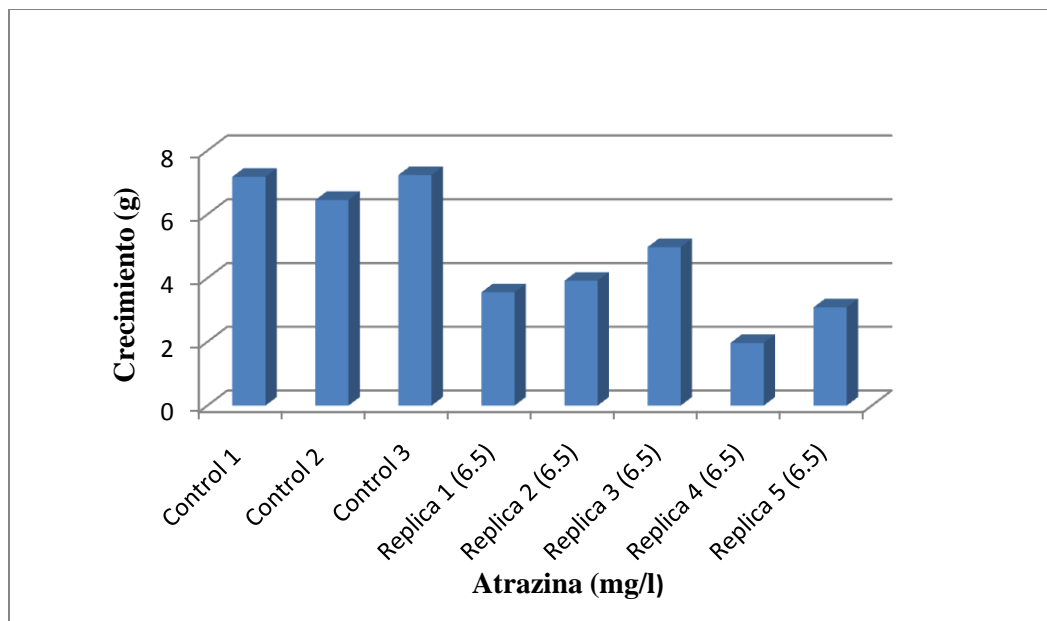


Figura 12. Crecimiento total por réplica de concentración durante el bioensayo subcrónico de toxicidad.

La evaluación de la especie *Oreochromis niloticus* en el bioensayo subcrónico con las réplicas de concentraciones durante 21 días arrojó valores del campo de crecimiento por réplica y concentración. El coeficiente de correlación r^2 se determinó para el campo de crecimiento en g/g pv/día (P1) y las concentraciones ensayadas, fue de -0.356555 (Fig. 13), posteriormente se determinó el coeficiente de correlación entre el campo de crecimiento en g (P3) y las concentraciones control y subcrónica, siendo de -0.9000 (Fig.14).

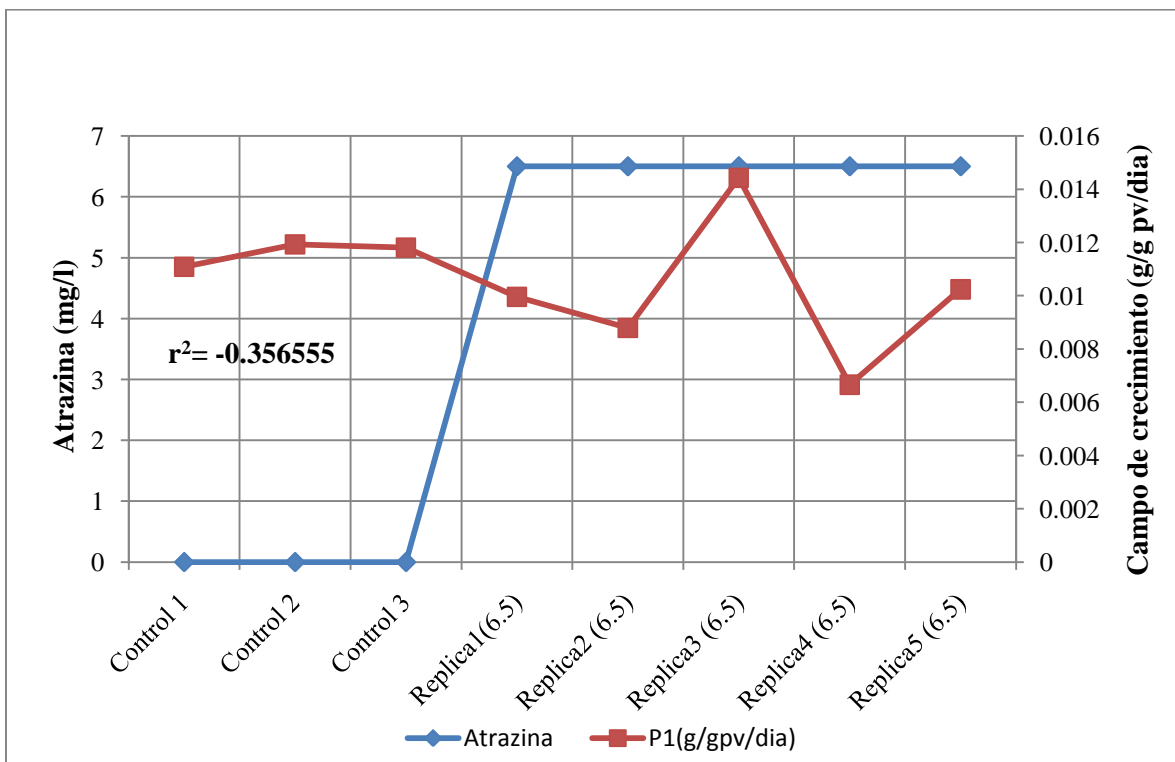


Figura. 13. Correlación entre las réplicas de concentración y el campo de crecimiento relativo para la especie *Oreochromis niloticus*, durante el bioensayo subcrónico de toxicidad.

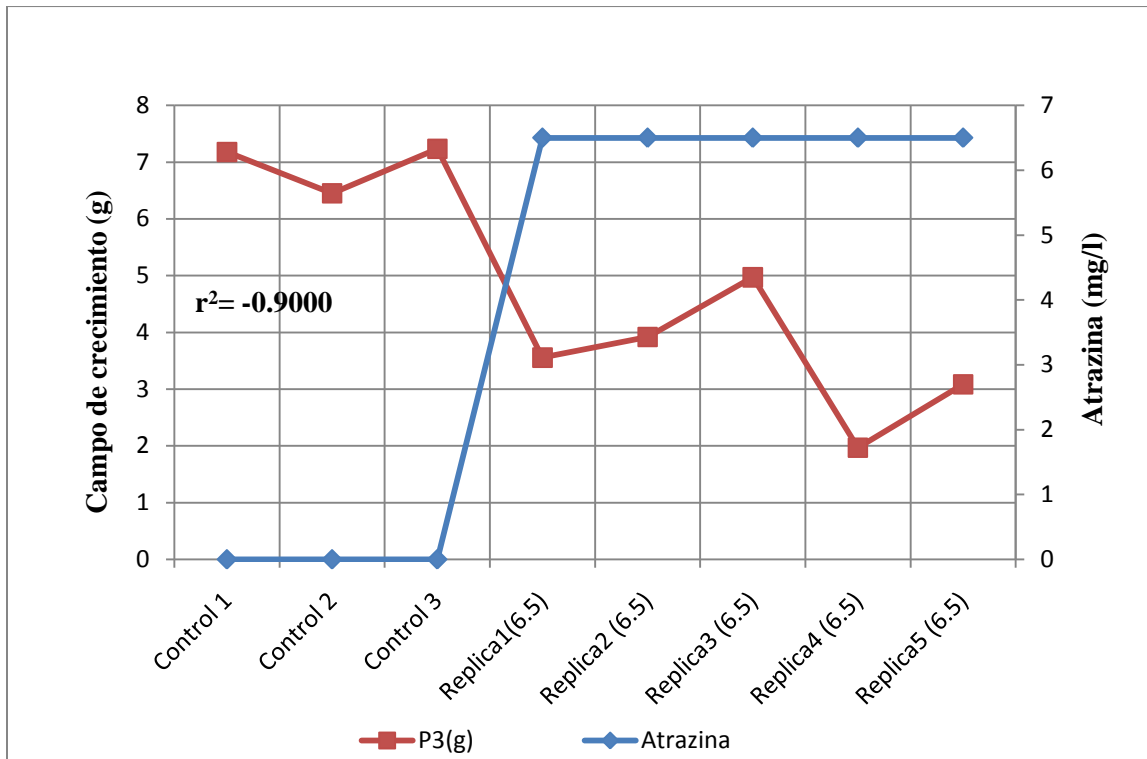


Figura. 14. Correlación entre las réplicas de concentración y el campo de crecimiento total para la especie *Oreochromis niloticus*, durante el bioensayo subcrónico de toxicidad.

En el análisis de Test Student, se obtuvieron dos grupos los controles (A) y los valores crónicos (B), para los que se obtuvo un valor de probabilidad = 0.0007 < valor crítico = 0.05, lo cual indica diferencias significativas en el campo de crecimiento de los controles y de las réplicas de la concentración subcrónica (Fig.15).

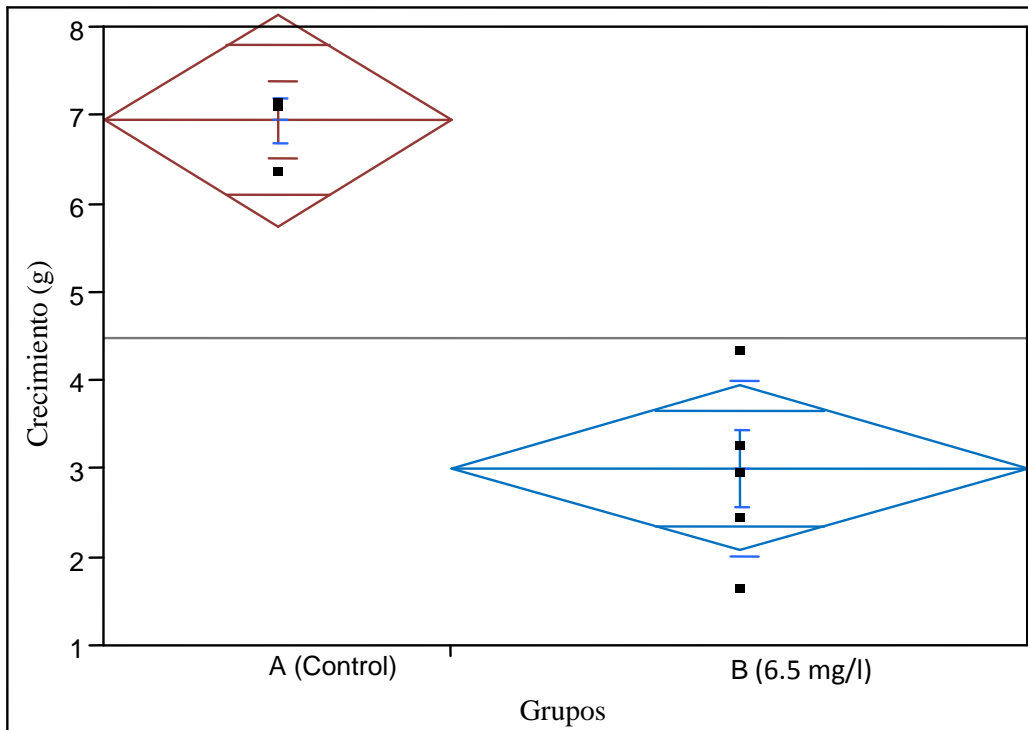


Figura. 15. Crecimiento de la especie *Oreochromis niloticus*, para el grupo control y crónico.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

5.1. Bioensayo agudo

Analizando los resultados obtenidos en ambos bioensayos, se constató que la especie *Oreochromis niloticus* en condiciones idóneas, posee una tasa de crecimiento acelerado, lo que permite evaluar los efectos causados por los contaminantes a corto, mediano y largo plazo. Adicionalmente observamos su gran adaptación al cautiverio, lo que nos ayudó a no perder más del 10% de los ejemplares durante el período de aclimatación, sin estresar a los organismos evitando así retrasos, pérdidas económicas y a su vez disminuyendo la variabilidad de los resultados en las pruebas de toxicidad agudas y subcrónicas.

La actual distribución y cultivo de la tilapia en diferentes estados del país permite desarrollar los ensayos toxicológicos en diferentes regiones, cuyos resultados pueden ser extrapolados y comparados con el presente estudio. La especie además de tener la facultad de poder vivir tanto en aguas dulces como salobres, soportar altas densidades poblacionales e incluso acostumbrarse a las aguas poco oxigenadas, mostró ser muy tolerante a los efectos agudos y subcrónico del herbicida. Observamos que los juveniles más pequeños en peso y talla resistían en mayor grado los efectos agudos producto de la exposición al herbicida.

Durante la aclimatación y el desarrollo de los bioensayos, los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron dentro de los niveles óptimos, por lo que se puede suponer que no se registró mortandad por causa de éstas. En el bioensayo agudo la temperatura promedio fue de $29.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$, el oxígeno disuelto fue de 7.6 ± 0.12 y el pH de 8.15 ± 0.03 . Durante todo el bioensayo se observaron las reacciones y se registró la mortalidad. El criterio utilizado para considerar a un pez muerto fue cuando se observó la carencia de movimiento, especialmente si no existe movimiento en el opérculo branquial. También puede ser detectado si al tocarle la aleta caudal, no existe respuesta alguna (Zapata, 2008). Una vez muertos se retiraron para evitar interferencias.

Las *Guía para la calidad del agua potable* de la Organización Mundial de la Salud, en su edición de 1993 estableció 0.002 mg/l como el valor de referencia para la atrazina basado en sus efectos sobre la salud humana. Concluyeron que las pruebas obtenidas en diversos estudios de genotoxicidad indican que la atrazina no era genotóxica. Aunque reconocen que existen pruebas de que la atrazina puede inducir tumores de mama en ratas, es muy probable que el mecanismo de este efecto no sea genotóxico. (OMS, 2006). En la actualidad se están realizando estudios de citotoxicidad en células humanas. La EPA (EPA 815-F-00-007) tiene 0.003mg/l como el nivel máximo de atrazina para agua de agua potable, de superar este valor se pueden presentar trastornos cardiovasculares o del sistema reproductor. La Unión europea en sus Normas de calidad ambiental DIRECTIVA 2008/105/CE para sustancias prioritarias y contaminantes maneja 0.002 mg/l de atrazina como la concentración máxima admisible en sus aguas superficiales (UE, 2008). La atrazina está clasificada como ligeramente tóxico, sin embargo los efectos agudos para muchos organismos no blancos aún son desconocidos, aunque lo más preocupante son los efectos crónicos y subcrónicos, porque con una exposición baja pero constante pueden ocasionan primeramente daños a nivel subcelular antes de reflejarse en la población, como por ejemplo, modificaciones en los patrones de crecimiento y reproducción (Segnini *et al.* 2005), finalmente la pérdida de biodiversidad y deterioro de los ecosistemas. La NOM-127-SSA1 establece 0.002 mg/l de atrazina como límite máximo permisible, sin embargo la legislación ambiental mexicana no proporciona suficiente información sobre la calidad y tratamiento del agua para su potabilización, ni tienen un programa permanente de monitoreos ambientales para determinar el nivel de contaminación de los cuerpos de agua por herbicidas triazínicos.

Como resultado del bioensayo agudo se obtuvo con 72 horas de exposición a Triazinas una CL_{50} de 8.5902 mg/l, la CENO fue de 6 la CEM de 7 y la concentración crónica MCTP de 6.5 ± 0.01 mg/l. Lo que nos permite compararlos con los resultados registrados en la Tabla 15 a continuación:

Tabla 15. Resultados de bioensayos de toxicidad aguda.

Literatura consultada sobre Toxicidad aguda de atrazina en peces			
Especie	Nombré común	CL₅₀ (mg/l)	Referencias Bibliográficas
<i>Salvelinus fontinalis</i>	Trucha de arroyo	4.9	EPA (1987)
<i>Lepomis macrochirus</i>	Mojarra de agallas azules	6.7	EPA (1987)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arcoíris	9.9	Rodríguez y Almeida (2005)
<i>Cyprinus Carpio</i>	Carpa común	18.8	Nescovic <i>et al.</i> (1993)
<i>Rhamdia quelen</i>	Bagre negro	10.2	Kreutz <i>et al.</i> (2008)
<i>Pimephales promelas</i>	Carpita cabezona	15	Macek <i>et al.</i> (1976)
<i>Leiostomus xantarus</i>	Spot, croca	8.5	Ward and Ballantine (1985)
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Tilapia, mojarra	8.8	Prassad y Reddy (1994)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia, mojarra	5.02	Bothelo <i>et al.</i> (2009)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia, mojarra	9.37	S.Y.Hussein, (1996)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia, mojarra	8.58	En el presente estudio

De acuerdo a la tabla anterior, podemos observar que la toxicidad aguda (CL_{50}) de atrazina para diferentes especies de peces tanto de agua dulce como salobres, muestran un rango de concentración entre 4.9 y 18.8 mg/l. Al comparar las concentraciones letales medias del género *Oreochromis* nos damos cuenta que para los adultos de *Oreochromis mossambicus* la CL_{50} fue de 8.8 durante 72 horas (Prasad y Reddy, 1994). Para alevines de *Oreochromis niloticus* la CL_{50} fue de 5.02 a 96 horas (Bothelo, 2009), por su parte Hussein (1996) reportó para adultos de *Oreochromis niloticus* una CL_{50} de 9.37 a 96 horas. Hay que señalar que las diferencias en la toxicidad se deben a ciertos factores como la temperatura, que influye en los procesos de los herbicidas sobre la toxicidad de los organismos, siendo estos mayores en las condiciones tropicales, donde la actividad metabólica es más intensa, entonces se puede decir que los valores medidos para CL_{50} en condiciones templadas serán mayores si se compara con las condiciones tropicales (Bothelo, 2009). Los resultados de los ensayos de toxicidad se ven afectados por el tipo de contaminante evaluado, en el caso de los herbicidas, estos estudios de ecotoxicología son relevantes debido a: la cantidad total que se aplica anualmente en el medio ambiente, por lo menos cuatro veces más que la observada para los fungicidas (Sindag, 2006), las horas de exposición, las diferencias entre especies así como los estadios de las mismas porque la toxicidad de un compuesto en la misma especie de pez varía entre larvas, alevines, juveniles y adultos.

Según Rondón-Barragán *et al.* (2010) existen gran cantidad de trabajos asociados a los efectos deletéreos de los herbicidas sobre la reproducción e incluso sobre el crecimiento de diversas especies de peces, sin embargo la profundización en las alteraciones sobre el sistema inmune de animales aún es escasa. Rondón-Barragán describe algunos efectos observados durante bioensayos agudos. En este trabajo se observaron los efectos que se mencionan a continuación y posibles causas:

Obscurecimiento del pez: Este síntoma de intoxicación es posiblemente debido al daño celular y estrés oxidativo generado por la atrazina.

Los peces flotan en la superficie del agua sin poder consumir oxígeno (boquean):

Las fuentes consultadas suelen concordar en que la atrazina muestra una gran capacidad para romper la integridad estructural de las branquias en los peces. Lo que nos permite asumir que como resultado de la eficiencia reducida de las branquias dañadas para funcionar como órganos respiratorios, los tejidos metabólicamente activos como el hígado y el músculo reciben menos oxígeno, lo que conduce a una situación de hipoxia grave.

Presentan movimientos muy rápidos y en varias direcciones (descoordinación):

Los peces presentaron movimientos bruscos con la cabeza hacia abajo y la cola hacia arriba (nado vertical) golpeándose contra las paredes de los recipientes.

En las concentraciones de 9, 10 y a 12 ppm la mayoría de los peces tratados tenían hinchazón abdominal (Ascitis):

Posiblemente producto de los daños en las células renales y hepáticas. Las heces eran irregulares blancas y demasiado delgadas.

Reflejos lentos (aletargamiento):

este comportamiento anormal puede ser atribuido a los efectos de la atrazina en el sistema nervioso central y sistema cardiovascular (Antychowicz *et al.*, 1979), y podría deberse en menor grado a una reducción en el contenido de oxígeno del agua, debido a la presencia del herbicida (Olli, 1996).

5.2. Bioensayo Subcrónico

Resulta más sensible medir la eficiencia de conversión del alimento y su destino (respiración, excreción y crecimiento) que medir el crecimiento bruto de los peces (Sprague, 1971). Se puede demostrar la utilidad de la determinación del campo de crecimiento, ya que las variables incluidas en su determinación como la ingestión, eficiencia de asimilación, asimilación, respiración y excreción; arrojan más información sobre la afectación que provoca un contaminante en este caso en la especie *Oreochromis niloticus*, que un solo valor de crecimiento.

Existen factores como la temperatura, Oxígeno disuelto, densidad, tóxicos y manipulación del hombre que tienen un efecto sobre el crecimiento, modificando la dirección y flujo de la energía metabólica (Martínez-Porchaz, 2009), pues bajo condiciones de estrés se vuelve más importante el mantenimiento o supervivencia del organismo que el crecimiento, lo cual tiene como consecuencia una menor eficiencia de absorción en el uso del alimento suministrado. Solamente bajo condiciones adecuadas se destina la mayor cantidad de energía y proteína para crecimiento. Es por ello que durante el bioensayo se mantuvieron constantes las condiciones de temperatura, oxígeno disuelto y pH; pues la constante variación en estos parámetros puede causar estrés en los peces y a su vez causar afectación en la tasa de ingestión y crecimiento.

Se alimentó a los peces a base de una dieta de purina (proteínas, grasas, carbohidratos y fibra en base seca) especial para la especie cultivable *Oreochromis niloticus*, comúnmente llamada mojarra. La energía es obtenida a partir de los macronutrientes (proteínas, lípidos y carbohidratos); los aminoácidos que forman las proteínas son esencialmente utilizados por los organismos para la formación de tejidos. Los lípidos y carbohidratos en cambio son utilizados principalmente para la obtención de energía (Martínez-Porchas, 2005). Entonces la cantidad y calidad de los nutrientes ingeridos, tienen un efecto directo sobre el crecimiento. Así si se alimenta con mayor número de proteínas y pocos carbohidratos, el organismo consumirá las proteínas que deben ser destinadas al crecimiento y si el alimento tiene alta cantidad de energía y poca proteína, el organismo cubrirá sus necesidades energéticas pero no tendrá proteínas suficientes para formar tejido. Así es que los datos obtenidos como variables

para calcular el campo de crecimiento y el mismo crecimiento, fueron obtenidos bajo condiciones adecuadas para el desarrollo de los peces.

Es importante mencionar que la ingestión (I), eficiencia de absorción asimilación (U^*) y asimilación (A) tienen coeficientes de correlación con el campo de crecimiento P1 (g/gPV/día) de 0.806, 0.349 y 0.903 respectivamente, esto significa que cada una de estas variables tiene una relación directamente proporcional con el campo de crecimiento, pues mientras la ingestión (I), eficiencia de absorción asimilación (U^*) y asimilación (A) aumentan el campo de crecimiento también lo hace, pero no en el mismo grado con cada variable. Esto se puede observar por ejemplo con la réplica 5 de concentración 6.5 mg/l que aunque presenta una mayor ingestión (I) y una menor eficiencia de asimilación (U^*) que el control 1, tiene mayor asimilación que el mismo control (Tabla 13). Esto debido a que el campo de crecimiento depende más de la ingestión que de la eficiencia de absorción, reflejado en los valores de correlación.

Al determinar el coeficiente de correlación para el campo de crecimiento en g/g PV/día (P1) y las concentraciones ensayadas, este fue de -0.3565 (Fig. 13), posteriormente el coeficiente de correlación entre el campo de crecimiento en g (P3) y las concentraciones control y subcrónica fue de -0.9000 (Fig. 14). Estas variaciones se deben a que como se puede observar (Figs. 8, 9 y 10) la ingestión, eficiencia y asimilación del control y la concentración subcrónica de acuerdo a sus réplicas, están evaluadas de acuerdo a una tasa, es decir, el campo de crecimiento P1, está expresado en función del peso ganado entre el promedio de peso vivo de las réplicas y a su vez entre los 21 días de ensayo y al obtener el campo de crecimiento, se tiene una tasa que se encuentra en función de un peso vivo diferente para cada réplica, se produce una relación de proporción inversamente proporcional entre el crecimiento y el peso vivo. Lo anterior es importante debido a que los controles tienen pesos mayores a los pesos de las réplicas de concentración crónica. Entonces la proporción arroja datos para las réplicas de concentración crónica cercanos o mayores a los valores de P1 para el control, como en el caso de la réplica 3 (Tabla 14), el valor de correlación -0.3565 hace suponer que son inversamente proporcionales, pero no existe marcada diferencia entre el crecimiento de los controles y las réplicas del subcrónico, como lo indicaría el análisis

de varianza con un valor de probabilidad =0.1095. Sin embargo esa interpretación no es correcta, el valor de crecimiento únicamente en gramos para los controles y subcrónica fue de -0.9000, ya que no se incluyó el peso vivo lo que arroja una relación inversamente proporcional dentro de las mismas tasas, disminuya la diferencia entre los valores del campo de crecimiento y el valor de correlación respecto al -1.

Al comparar los resultados con otros bioensayos de toxicidad realizados por la EPA, (1992) con valores crónicos de toxicidad para herbicidas del grupo químico triazinas, en este caso para la atrazina siendo este el que más representa al grupo químico, se evaluó a las siguientes especies representantes de invertebrados acuáticos, la pulga de agua (*Daphnia magna*), mosquito (*Chironomus tentans*) y el crustáceo (*Gammarus fasciatus*); y las especies de peces de agallas azules (*Lepomis macrochirus*), piscardo (*Pimephales promelas*) y trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) fueron expuestos en forma crónica a diferentes concentraciones de atrazina para cada especie y por separado en los sistemas de agua. Se obtuvieron valores crónicos en orden decreciente por especie: *Pimephales promelas*, *Daphnia magna*, *Chironomus tentans*, *Lepomis macrochirus*, *Lepomis macrochirus* y *Gammarus fasciatus*. Las concentraciones fueron menores al valor crónico obtenido en este trabajo para *Oreochromis niloticus* (6.5 mg/l) aunque las CL₅₀ tuvieron valores cercanos, lo que destaca que la especie ensayada es más resistente. Las características fisiológicas, físicas, edad, tamaño del organismo influyen mucho en el resultado de los ensayos, ya que *Oreochromis niloticus* no presenta un exoesqueleto como los crustáceos, pero se adecúa a las características del método de crianza, soportando el estrés de manipulación y variaciones en los parámetros fisicoquímicos del agua.

Los peces expuestos a la atrazina durante el bioensayo subcrónico en su etapa final mostraron algunos signos clínicos tales como respiración rápida, el aumento de la frecuencia de los movimientos de la cubierta de las agallas, cambio de coloración a un tono más oscuro, disminución de los reflejos y los movimientos de natación y la reducción de las actividades de alimentación. Sin embargo no presentaron hinchazón abdominal y movimientos bruscos, características observadas en los peces durante el bioensayo agudo. Comparando los resultados con otro estudio, Hussein *et al.* (1996)

en el que trabajaron con *Oreochromis niloticus* se presentan características clínicas similares a las observadas, pero obtuvieron una concentración crónica de 6 mg/l durante un tiempo máximo de 30 días menor que la de 6.5 mg/l para el bioensayo subcrónico. Esto puede ser debido a que aunque se ensayo el mismo contaminante, trabajaron con una pureza de 96 % y organismos que inicialmente pesaban 38.46 ± 2.70 , mientras que en este trabajo se ensayo la atrazina al 80 % y con un promedio de peso para el control de 18.37 ± 3.5 y para las réplicas 10.16 ± 4.21 . Así en este trabajo se ensayo con menor cantidad de atrazina ya que en ambos trabajos se evaluó el producto registrado con una marca comercial y con ingredientes inertes diferentes. Si se desea expresar la cantidad real de atrazina al 80 % para el valor crónico encontrado en este ensayo es de 5.2 mg/l.

El campo de crecimiento también fue evaluado mediante la prueba de T. Student en el cual se agrupó los campos de crecimiento, satisfactoriamente se pudo observar, que los controles pertenecían a un grupo y a otro grupo las réplicas de la concentración crónica (Fig. 15). Así las cinco réplicas de concentración crónica tienen un campo de crecimiento menor a las réplicas de los controles, resultado de la exposición a la atrazina.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

La CL_{50} a 72 horas hallada para atrazina en *Oreochromis niloticus* es de 8.5902 ± 0.090277

Las concentraciones de la CENO es de 6 ppm, el de la CEM 7 ppm, por lo que la media aritmética MTCP viene siendo 6.5 ± 0.01 ppm, por los errores de medición.

Se determinó que tasa de ingestión, eficiencia de asimilación, asimilación, tasa de respiración y excreción promedios por día de un organismo de la especie *Oreochromis niloticus* expuesto a una concentración de 6.5 ppm de herbicida Triazinas fueron $I = 0.23281g \pm 0.0473$, $U^* = 81.96 \pm 1.7595$ $A = 0.1822$ $R = 4.1866 \pm 1.41$ $U = 0.000369$.

El análisis de varianza nos indicó que existían diferencias significativas entre la mortalidad producida por diferentes concentraciones del herbicida, por lo que concluimos que la mortalidad está directamente relacionada con la concentración, a mayor concentración mayor mortalidad.

En el ensayo subcrónico la herramienta estadística mostró diferencias significativas entre el campo de crecimiento del control y el grupo expuesto a la concentración de 6.5 ppm.

No se descarta que de continuar con el uso masivo de Triazinas se corra el riesgo de causar efectos adversos a los peces y otros organismos acuáticos. La revisión de las bases de datos y los límites máximos permisibles en México nos proporciona muy poca información sobre la toxicidad de los herbicidas triazínicos en peces. En Quintana Roo, específicamente en el río Hondo, se han realizado diversos estudios, entre los que se encuentra el realizado por Euán-Ávila, (2002) donde se reportaron los avances para caracterizar las fuentes no puntuales o difusas de contaminación agrícola y su potencial influencia en la bahía de Chetumal, aún hace falta realizar más estudios de este tipo que nos permita realizar índices de la toxicidad para tomar acciones preventivas y correctivas, ante de los herbicidas clorados que pone en riesgo la salud de las especies acuáticas locales e indirectamente al ser humano.

CAPITULO VII

RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar más estudios sobre las afectaciones de los herbicidas en los ecosistemas de nuestro Estado, así como monitoreos de la calidad del agua para caracterizar y conocer la concentración en la que se encuentran.
2. Debido al auge del uso en los herbicidas surge la necesidad de contar con métodos de determinación, sensibles, sencillos y económicos para un control analítico de los herbicidas. Así como la implementación de tecnologías que permitan la degradación de los mismos.
3. Seguir evaluando los efectos crónicos que tienen los agroquímicos en especies similares, para tener una base de datos de los efectos generacionales, lo que es ideal en estudios de carcinogénesis y teratogénesis.
4. Recomendamos tener algún tipo de experiencia previa en el manejo o crianza de peces, para así evitar una mayor mortandad durante el periodo de aclimatación.
5. Si se trabaja con peces se debe tener toda la información posible sobre la especie, con la tilapia mucho cuidado con el manejo y transporte. una vez concluido los ensayos, tener en cuenta que los sobrevivientes o la reserva no deben arrojarse a ningún cuerpo de agua, porque la CONABIO la considera como especies invasoras establecida en México, que se reproducen de manera descontrolada, causando daños serios a la biodiversidad, desplazando especies nativas de la región.
6. Apegarse a una metodología de bioensayos para evitar cometer errores que afecten significativamente los resultados obtenidos.

CAPITULO VIII
LITERATURA
CITADA

VIII. LITERATURA CITADA

Aaronson M.J., (1980) Identification and confirmation of atrazine in pond water. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 25: 492-498.

Antychowicz J., Szymbor E. y Roszkowski J., (1979) Investigations upon the effects of some pesticides on carp (*Cyprinus carpio*) Bull. Vet. Inst. In Pulawy 23: 3/4 124-130.

APHA (American public health association), AWWA (American water works association), (1992). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Edición 17, México. Editorial Diaz de Santos, S.A.

ATSDR (2003) Resumen de Salud Pública, Atrazina CAS#: 1912-24-9. Disponible en http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs153.pdf.

Botelho R.G.,(2009) La toxicidad aguda de los herbicidas tilapia (*Oreochromis niloticus*). Malezas [en línea]. 2009, vol.27, no.3 [citado 07/09/2011], pp 621-626. Disponible en <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010083582009000300024&lng=en&n m=iso>. ISSN 0100-8358. doi: 10.1590/S0100-83582009000300024

CICLOPLAFEST,(2004). Catalogo de Plaguicidas. Disponible en http://www.cofepris.gob.mx/wb/cfp/catalogo_de_plaguicidas

Conover R.J., (1966). La asimilación de la materia orgánica por zooplancton. Limnol. Oceanogr. 11, 338-346.

De la Lanza-Espino G., Hernández S.P. y Carbajal Pérez J.L., (2000). Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (Bioindicadores), 1ª edición, México, Plaza y Valdés.

Diana S.G., Resetarits W.J., Schaeffer D.J., Beckmen K.B. y Beasley V.R., (2000). Effects of atrazina on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities. *Environ. Toxicol. Chem*, 19(12): 2961-2967.

Diario Oficial de la Unión Europea (2008). Directiva 2008/105/CE Del Parlamento Europeo Y Del Consejo. Consultado en 12/07/2011 en <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:348:0084:0097:ES:PDF>.

Encina F. y Díaz O., (2000). Contaminación, estimación del riesgo ecológico y protección asociado de algas bentónicas marinas. Universidad Católica de Temuco-Universidad de Chile. 13 pp.

EPA-600/3-76-047(1976). Chronic Toxicity of Atrazine to Selected Aquatic Invertebrates and Fishes. Consultado en

http://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=NM2m_ygRTTgC&oi=fnd&pg=PP11&dq=Chronic+Toxicity+of+Atrazine+to+Selected+Aquatic+Invertebrates+and+Fishes&ots=vhtZ-F6b2L&sig=yPSVCETOWcF_yPj4fU0EJJYcPa4#v=onepage&q&f=false.

EPA 822-D-01-002 (2001). Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Atrazine-Draft. Consultado en

<http://nepis.epa.gov/EPA/html/DLwait.htm?url=/Exe/ZyNET.exe/20003H8P.PDF?ZyActionP=PDF&Client=EPA&Index=2000Thru2005&File=D%3A%5CZYFILES%5CINDEX%20DATA%5C00THRU05%5CTXT%5C00000004%5C20003H8P.txt&Query=&SearchMethod=1&FuzzyDegree=0&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&QField=pubnumber%5E%22822D01002%22&UseQField=pubnumber&IntQFieldOp=1&ExtQFieldOp=1&Docs=>.

EPA 815-F-00-007., (2000). Estándares Del Reglamento Nacional Primario De Agua Potable, EPA. Disponible en <http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/e/cdcagua/normas/mundo/USA/01.estandares.pdf>

Escalante Espinoza Erika, (2000). Tesis estudio de ecotoxicidad de un suelo contaminado. Consultado en <http://148.206.53.231/UAMI10492.PDF>.

Espina S., Díaz F., Rosas C. y Rosas I., (1986). Influencia del detergente sobre el balance energético de *Ctenopharyngodon idella* a través de un bioensayo crónico. Contaminación ambiental. 2:25-37.

Euán-Ávila J.I., Liceaga-Correa M.A., y Rodríguez-Sánchez. H., (2002). Caracterización de fuentes no puntuales de contaminación agrícola en el municipio de Otón P. Blanco Quintana Roo, y su potencial influencia en la Bahía de Chetumal.

Felsot A.S., (2001). Herbicide tolerant genes, Part 4. Withering wildlife?. *Agrochem. Environ. News.* 178: 1-8.

Fischer-Scherl T., Veaser A., Hoffmann R.W., Kühnhauser C., Negele R.D. y Ewringmann T., (1991) Morphological effects of acute and chronic atrazine exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Arch Environ Contam Toxicol 20: 454-461.

Gómez-Brindis J.G., (2006). Herbicidas agrícolas: formulaciones, usos dosis y aplicación, 2ª edición, México, Trillas,

Hayes T., Collins A., Lee M., Mendoza M., Noriega N., Stuart A. y Vonk A., (2002) Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5476–5480

Hussein S.Y., El-Nasser M. A. y Ahmed S. M., (1996). Comparative Studies on the Effects of Herbicide Atrazine on Freshwater Fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut, Egypt. Consultado en <http://www.springerlink.com/content/0txja0wervf2308r/fulltext.pdf>.

Ivlev V.S., 1939. Energy balance in the carp. *Zoolog Zhurn* 18: 303-318.

Klekowski K.R. y Duncan A., (1975). Enfoque fisiológico de la energética ecológica, pp 15-36. En: W.R.Z. Grodzinski, K.R. Klekowski y A. Duncan (Eds.) *Métodos de Bioenergética ecológica*. Blackwell Science, Oxford.

Larraín A., (1995). Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. *Ciencia y tecnología marina CONAMA, Chile (edición especial)*. 39-47 pp.

Manejo Integral de Recursos Costeros (2002). Contribuciones de la ciencia al manejo costero integrado de la bahía de Chetumal y su área de influencia. Chetumal: Universidad de Quintana Roo.

Martínez-Porchas M., (2005). Efecto de la proporción proteína/energía dietética en el desempeño biológico de *Litopenaeus vannamei* en baja temperatura. Universidad de Sonora. Tesis de Maestría. 47pp.

Martinez-Porchas M., (2009). *Dinámica del crecimiento de peces y crustáceos*. Consultado en http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_peces/piscicultura/121crecimiento.pdf.

Olli O., (1966) Damage in fish caused by water pollution in Finland. *Bull off Int Epiz* 65(5-6): 571-582.

OMS (2003). Atrazine in drinking-water. Documento de referencia para la elaboración de las Guías de la OMS para la calidad del agua potable. Ginebra (Suiza), Organización Mundial de la Salud (WHO/SDE/WSH/03.04/32). Consultado en <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsacg/e/cd-cagua/guias/b.parametos/4.BasTox/WHO/010.atrazine.pdf>

Oropeza-Jiménez A. L., (2009). Efecto de la Simazina en el Metabolismo Energético de las Carpas Comunes. Caceres España, Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and agricultural Wastes, 44(2):144-156

Organización Mundial de la Salud (2006). Guías para la toxicidad del agua potable Volumen 1, Recomendaciones. Consultado en http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf

Ortiz M.C., (Coord.) (1997). Estudio Emergente sobre la mortandad de Bagres en la Bahía de Chetumal. Informe Técnico ECOSUR-SIMAP. 86 pp.

Ortiz M.C., Sáenz R.M., Botello A.V., Díaz G.G. y Jasso B.M., (1997). Presencia de Plaguicidas en la población Rural y su impacto Ecológico en el Rio Hondo, Quintana Roo, México. Informe Técnico. ECOSUR-CONACYT. 35 pp.

Ortiz M.C., Saénz R.M. y Zavala A.M., (1997). Plaguicidas Organoclorados e Hidrocarburos Aromáticos. In: Estudios Emergente sobre la Mortandad de Bagres en la Bahía de Chetumal. Ortiz, M.C (Coord.). Informe Técnico p.22-34

Prasad T.A.V. y Redy D.C., (1994). Atrazine toxicity on hydromineral balance of fish Tilapia mossambicus. Ecotoxicol. Environ. Safety 28:313-316.

Rondón-Barragán I.S., Pardo-Hernández D. y Eslava-Mocha P.R., (2010). Efecto de los Herbicidas sobre el sistema inmune: una aproximación en peces, Argentina *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2010 4(1): 1-22*

Rosas C., Sánchez A., Chimal E. y Brito R., (2003). Manual de Métodos para la evaluación del Balance energético en Crustáceos. Consultado en http://www.uantof.cl/recursos_mar/pdf/Crosas/Manual%20bioenerg%C3%A9tica%20jornadas.pdf.

Saavedra-Martínez M.A., (2006). Manejo del Cultivo de Tilapia. Consultado en 06/7/2011 en http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNADK649.pdf.

SAGARPA, SINCOAGRO S.C, FUNPROVER, COVECA (2011). Manual de Producción de Tilapia con Especificaciones de calidad e Inocuidad. Consultado en 07/03/2011 en <http://www.funprover.org/formatos/cursos/Manual%20Buenas%20Practicas%20Acuicolas.pdf>

Secretaría de Comercio y Fomento Industrial et al. (1995). NMX-AA-087-SCFI Analisis de Agua-Evaluación de Toxicidad aguda con *Daphnia magna* status (Crustacea-Cladecera)-Metodo de Prueba. Consultado en <http://www.semarnat.gob.mx/leyesy normas/ Normas%20Mexicanas%20vigentes/NMX-AA-087-1995.pdf>.

Segnini M.I., Medina J., Marcano S., Finol H.J. y Boada A., (2005). Effects of herbicide on the kidneys of two Venezuelan cultured fish: *Caquetaia kraussii* and *Colossoma macropomum* (Pisces: Ciclidae an Characeae). *Int J Trop Biol*, 53(Suppl 1):55-59

SINDAG (2006). Disponível em <<http://www.sindag.com.br/>>. Acesso em: 05 jun. 2008.

Steffens W., (1987). Principios básicos de la alimentación de los peces, España: Acribia.. 275 p

Sprague J. B., (1971). Measurement of pollutant toxicity to fish. 111-Sublethal effects and "safe" concentration. *Water Res.*, 5, 254-266.

Vega-Maria E., Diaz F. y Espina S., (2004). Balance energético de juveniles de *Chirostoma estor estor* (Jordan, 1978) (Pisces, Atherinopsidae) en relación con el tamaño corporal. *Hidrobiológica*, 14:113-120

Wacksman M. N., Maul J. D. y Lydy M. J., (2006). Impact of Atrazine on Chlorpyrifos Toxicity in Four Aquatic Vertebrates Fisheries and Illinois Aquaculture Center and Department of Zoology, Southern Illinois University, Carbondale, Illinois 62901, USA *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 681–689

Wiegand C., Krause E., Steinberg C. y Plugmacher S., (2001). Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49(3): 199-205.

Winberg G.G., (1956). The rate of metabolism and food requirements of fishes. Belorussian University. Minsk. In Russian, (Engl. Transl. *Fisheries Research Board of Canada Translation Series*, 194).

Zapata-Pérez O. y Pedrero-Ríos J. M., (2008). Ensayo de toxicidad aguda con larvas y juveniles de los peces tilapia, carpa y cíclidos, en: Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Compilador: Ania Mendoza Cantú, Patricia Ramírez Romero. INE-SEMARNAT 414 pp.

CAPITULO IX

ANEXOS

IX. ANEXOS

Bioensayos Previos

Tabla 16. Bioensayo exploratorio para la determinación de las concentraciones agudas

1er bioensayo agudo para la determinación de CL ₅₀ de <i>Oreochromis niloticus</i>						26 de enero de 2011	
Control	10:00 a.m.	12:00 a.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
0.1 ppm	10:00 a.m.	12:00 a.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
1 ppm	10:00 a.m.	12:00 a.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
10 ppm	10:00 a.m.	12:00 a.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
100 ppm	10:00 a.m.	12:00 a.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	4	6	6	6	6	6	6
réplica 2	4	6	6	6	6	6	6
réplica 3	3	6	6	6	6	6	6
1er bioensayo agudo para la determinación de cl ₅₀ de <i>Oreochromis niloticus</i>						27 de enero de 2011	
Control	10:00 a.m.	12:00 a.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
0.1 ppm	10:00 a.m.	12:00 a.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0

réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
1 ppm	10:00 a.m.	12:00 a.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
10 ppm	10:00 a.m.	12:00 a.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	4	4	4
100 ppm	10:00 a.m.	12:00 a.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	4	6	6	6	6	6	6
réplica 2	4	6	6	6	6	6	6
réplica 3	3	6	6	6	6	6	6
1er bioensayo agudo para la determinación de CL ₅₀ de <i>Oreochromis niloticus</i>						28 de enero de 2011	
Control	10:00 a.m.	12:00 a.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
0.1 ppm	10:00 a.m.	12:00 a.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
1 ppm	10:00 a.m.	12:00 a.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
10 ppm	10:00 a.m.	12:00 a.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	1	1	1	1	1	1	1
réplica 2	1	1	1	1	1	1	1
réplica 3	5	5	5	5	5	5	5
100 ppm	10:00 a.m.	12:00 a.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	6	6	6	6	6	6	6
réplica 2	6	6	6	6	6	6	6

réplica 3	6	6	6	6	6	6	6
1er bioensayo agudo para la determinación de CL ₅₀ de <i>Oreochromis niloticus</i>						29 de enero de 2011	
Control	10:00 a.m.						
réplica 1	0						
réplica 2	0						
réplica 3	0						
0.1 ppm	10:00 a.m.						
réplica 1	0						
réplica 2	0						
réplica 3	0						
1 ppm	10:00 a.m.						
réplica 1	0						
réplica 2	0						
réplica 3	0						
10 ppm	10:00 a.m.						
réplica 1	3						
réplica 2	3						
réplica 3	6						
100 ppm	10:00 a.m.						
réplica 1	6						
réplica 2	6						
réplica 3	6						

Bioensayo Agudo

Tabla 17. Parámetros Físicoquímicos del bioensayo agudo a 72 horas

Parámetros Físicoquímicos día 1			
Concentración/Parámetros	OD (mg/l)	pH	T(°C)
Control	8.2	8.002	25.6
3	8.06	8.226	25.85
6	8.13	8.05	25.26
7	7.92	8.1	25.73
9	8.06	8.096	25.72
10	7.95	8.153	24.52
12	7.72	8.21	25.95
Promedio	8.005714286	8.11957143	25.5185714

Parámetros Fisicoquímicos día 2			
Concentración/Parámetros	OD (mg/l)	pH	T(°C)
Control	7.566	8.25	26.3
3	7.933	8.02	26.33
6	7.466	8.113	25.8
7	7.466	8.23	26.73
9	7.4	8.176	26.26
10	7.266	8.176	26.133
12	7.68	8.15	26.4
Promedio	7.539571429	8.15928571	26.279

Parámetros Fisicoquímicos día 3			
Concentración/Parámetros	OD (mg/l)	pH	T(°C)
Control	7.48	8.116	25.13
3	7.52	8.18	25.23
6	7.56	8.126	25.3
7	7.7	8.22	25.2
9	7.63	8.243	25.166
10	7.165	8.146	25.1
12	7.26	8.18	25.13
Promedio	7.473571429	8.173	25.1794286

Tabla 18. Promedios Generales de los Parámetros del bioensayo agudo

Concentración/Parámetros	OD (mg/l)	pH	T(°C)
Control	7.748666667	8.12266667	25.6766667
3	7.837666667	8.142	25.8033333
6	7.718666667	8.09633333	25.4533333
7	7.695333333	8.18333333	25.8866667
9	7.696666667	8.17166667	25.7153333
10	7.460333333	8.15833333	25.251
12	7.553333333	8.18	25.8266667
Promedio	7.672952381	8.15061905	25.659
Desviación estándar	0.126182471	0.03224526	0.22840923

Tabla 19. Observaciones de mortandad durante el bioensayo agudo

2do bioensayo agudo para la determinación de CL ₅₀ de <i>Oreochromis niloticus</i>							3 de Febrero de 2011
control	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
3 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
6 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
7 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
9 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica	0	0	0	0	0	0	0

3							
10 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
12 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica3	0	0	0	0	0	0	0
2do bioensayo agudo para la determinación de CL ₅₀ de <i>Oreochromis niloticus</i>							4 de Febrero de 2011
control	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
3 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
6 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0

7 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	1	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
9 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	1	1	1	1	1
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
10 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	1	1	1	1	2	2
réplica 2	0	0	1	1	1	1	1
réplica 3	1	2	2	2	2	2	2
12 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	2	2	2	2	2	3	3
réplica3	3	3	3	3	3	3	3
2do bioensayo agudo para la determinación de CL ₅₀ de <i>Oreochromis niloticus</i>							5 de Febrero de 2011
control	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0

3 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	0	0
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
6 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	0	0	0	0	0	1	1
réplica 2	0	0	0	0	0	0	0
réplica 3	0	0	0	0	0	0	0
7 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	1	1	1	1	1	1	1
réplica 2	0	0	1	1	1	1	1
réplica 3	0	1	1	1	2	2	2
9 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	1	1	2	2	2	2	2
réplica 2	0	0	1	1	1	1	1
réplica 3	0	0	3	3	3	3	3
10 ppm	10:00 a.m.	12:00 p.m.	02:00 p.m.	04:00 p.m.	06:00 p.m.	08:00 p.m.	10:00 p.m.
réplica 1	2	2	3	3	3	3	3
réplica 2	1	1	2	2	2	2	3
réplica 3	2	4	4	5	6	6	6
12 ppm	10:00	12:00	02:00	04:00	06:00	08:00	10:00 p.m.

	a.m.	p.m.	p.m.	p.m.	p.m.	p.m.	
réplica1	0	0	4	4	4	4	4
réplica 2	3	2	6	6	6	6	6
réplica3	3	3	5	5	5	5	5
2do bioensayo agudo para la determinación de CL ₅₀ de <i>Oreochromis niloticus</i>						6 de febrero de 2011	
Control	10:00 a.m.						
réplica 1	0						
réplica 2	0						
réplica 3	0						
3 ppm	10:00 a.m.						
réplica 1	0						
réplica 2	0						
réplica 3	0						
6 ppm	10:00 a.m.						
réplica 1	1						
réplica 2	0						
réplica 3	0						
7 ppm	10:00 a.m.						
réplica 1	1						
réplica 2	1						
réplica 3	2						
9 ppm	10:00 a.m.						
réplica	4						

1																						
réplica 2	3																					
réplica 3	4																					
10 ppm	10:00 a.m.																					
réplica 1	3																					
réplica 2	3																					
réplica 3	6																					
12 ppm	10:00 a.m.																					
réplica1	6																					
réplica 2	6																					
réplica3	5																					

Tabla 20. Relación de % de mortalidad / Probit empírico (Pr)

Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%
0	0	3.72	10	4.16	20	4.48	30	4.75	40	5.00	50	5.25	60	5.52	70	5.84	80	6.28	90	7.33	99.0
2.67	1	3.77	11	4.19	21	4.50	31	4.77	41	5.03	51	5.28	61	5.55	71	5.88	81	6.34	91	7.37	99.1
2.95	2	3.82	12	4.23	22	4.53	32	4.80	42	5.05	52	5.31	62	5.58	72	5.92	82	6.41	92	7.41	99.2
3.12	3	3.87	13	4.26	23	4.56	33	4.82	43	5.08	53	5.33	63	5.61	73	5.95	83	6.48	93	7.46	99.3
3.25	4	3.92	14	4.29	24	4.59	34	4.85	44	5.10	54	5.36	64	5.64	74	5.99	84	6.55	94	7.51	99.4
3.36	5	3.96	15	4.33	25	4.61	35	4.87	45	5.13	55	5.39	65	5.67	75	6.04	85	6.64	95	7.58	99.5
3.45	6	4.01	16	4.36	26	4.64	36	4.90	46	5.15	56	5.41	66	5.71	76	6.08	86	6.75	96	7.65	99.6
3.52	7	4.05	17	4.39	27	4.67	37	4.92	47	5.18	57	5.44	67	5.74	77	6.13	87	6.88	97	7.75	99.7
3.59	8	4.08	18	4.42	28	4.69	38	4.95	48	5.20	58	5.47	68	5.77	78	6.18	88	7.05	98	7.88	99.8
3.66	9	4.12	19	4.45	29	4.72	39	4.97	49	5.23	59	5.50	69	5.81	79	6.23	89	7.33	99	8.09	99.9

Tabla 21. Factor Ponderado (w)

	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
1	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002	0.003	0.005	0.006	0.008	0.01
2	0.015	0.019	0.025	0.031	0.040	0.050	0.062	0.076	0.092	0.11
3	0.131	0.154	0.180	0.208	0.238	0.269	0.302	0.336	0.370	0.40
4	0.439	0.471	0.503	0.532	0.558	0.581	0.601	0.616	0.627	0.63
5	0.637	0.634	0.627	0.616	0.601	0.581	0.558	0.532	0.503	0.47
6	0.439	0.405	0.370	0.336	0.302	0.269	0.238	0.208	0.180	0.15
7	0.131	0.110	0.092	0.076	0.062	0.050	0.040	0.031	0.025	0.01
8	0.015	0.011	0.008	0.006	0.005	0.003	0.002	0.002	0.001	0.00

Bioensayo Subcrónico

Tabla 22. Promedios de los parámetros fisicoquímicos medidos durante el bioensayo subcrónico con *Oreochromis niloticus*.

TIEMPO (días)	PARÁMETROS		
	TEMPERATURA (°C)	OXIGENO DISUELTO (mg/l)	pH
1	29.7	6.86	8.0175
2	29.675	6.57	8.0525
3	29.6	6.55	8.01625
4	29.6125	6.78	8.05
5	29.675	6.775	8.03625
6	29.5	6.17	8.06
7	29.612	6.19	7.15
8	29.654	6.37	8.053
9	29.637	5.86	8.077
10	29.624	6.55	8.076
11	29.425	5.9	7.88125
12	29.45	6.1875	7.5275
13	29.43	5.17	7.9775
14	29.58	6.31	7.95375
15	29.38	6.025	8.09875
16	29.3875	5.9875	8.01375
17	29.45	6.2625	7.93
18	29.1375	6.0625	7.96
19	29.2875	5.975	7.86625
20	29.3125	6.025	7.84875

21	29.514	5.77	7.886
PROMEDIOS	29.5068333	6.20714286	7.93009524
Desviación estándar	0.1507028	0.3972942	0.21855661

Tabla 23. Parámetros fisicoquímicos, Oxígeno y Nitrógeno Amoniacal consumido para la determinación de la tasa de respiración.

RÉPLICA	PARÁMETROS			
	TEMPERATURA (° C)	pH	OXIGENO CONSUMIDO (mg O₂/día)	N-NH₃ mg/día
Control 1	30.6	7.07	42.4	7.5995928
Control 2	30.5	7.34	44.8	8.399866156
Control3	30.3	7.16	53.6	16.39996799
Réplica 1 concentración 6.5	30.2	7.62	21.6	6.79985961
Réplica 2 Concentración 6.5	30.2	7.69	37.6	7.19960064
Réplica 3 Concentración 6.5	29.7	7.60	22.4	6.79965732
Réplica 4 Concentración 6.5	30.1	7.75	28.8	3.59938738
Réplica 5 Concentración 6.5	29.7	7.77	15.2	5.19872125

Tabla 24. Peso seco (ps), cenizas (c) y materia orgánica(pslc) en g de las muestras de heces producidas por *Oreochromis niloticus* durante el bioensayo subcrónico.

Concentración Atrazina mg/l	Muestra g	ps	c	Pslc
Control 1	2	0.5152	0.123	0.3922
Control 2	2	0.3998	0.0976	0.3022
Control3	2	0.4222	0.0837	0.3385
Réplica 1 concentración 6.5	2	0.4064	0.0985	0.3079
Réplica 2 Concentración 6.5	2	0.2989	0.0786	0.2203
Réplica 3 Concentración 6.5	2	0.3217	0.0823	0.2394
Réplica 4 Concentración 6.5	2	0.2973	0.0859	0.2114
Réplica 5 Concentración 6.5	2	0.4027	0.0812	0.3215

Tabla 25. Peso seco (ps), cenizas (c) y materia orgánica (pslc) en los equivalentes de alimento consumido por *Oreochromis niloticus* durante el bioensayo subcrónico.

Concentración Atrazina mg/l	Ps	c	Pslc
Control 1	55.2492	4.4768	50.7724
Control 2	50.815	4.7025	46.1125
Control3	59.405	4.9019	54.5031
Réplica 1 concentración 6.5	31.4491	2.7951	28.654
Réplica 2 Concentración 6.5	27.1009	2.0914	25.0095
Réplica 3 Concentración 6.5	38.11	3.1813	34.9287
Réplica 4 Concentración 6.5	21.9888	1.8849	20.1039
Réplica 5 Concentración 6.5	28.0237	2.0973	25.9264

BIOENSAYO PREVIO

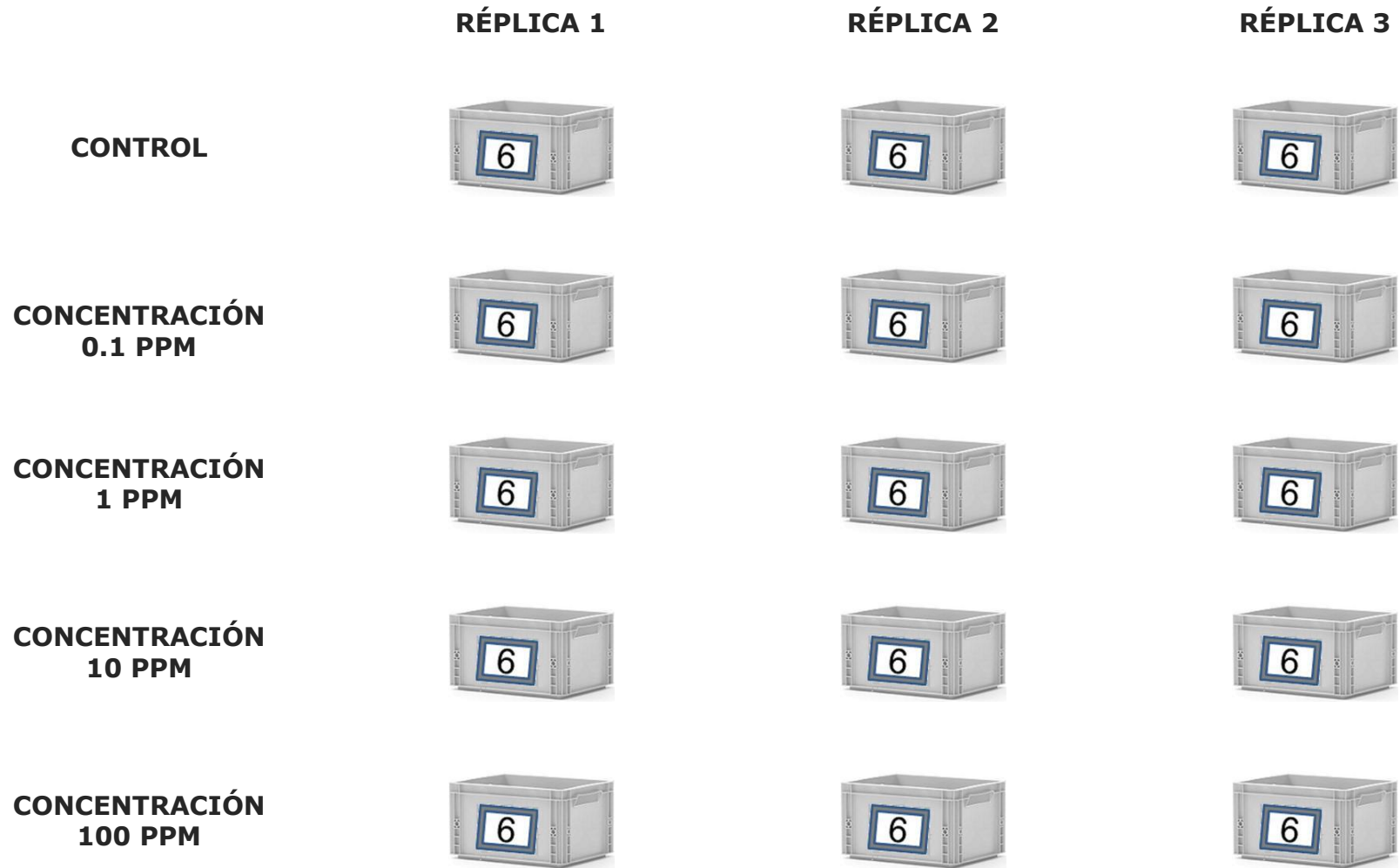


Figura 16. Esquematización de la cámara de bioensayo previo

BIOENSAYO AGUDO A 72 HRS

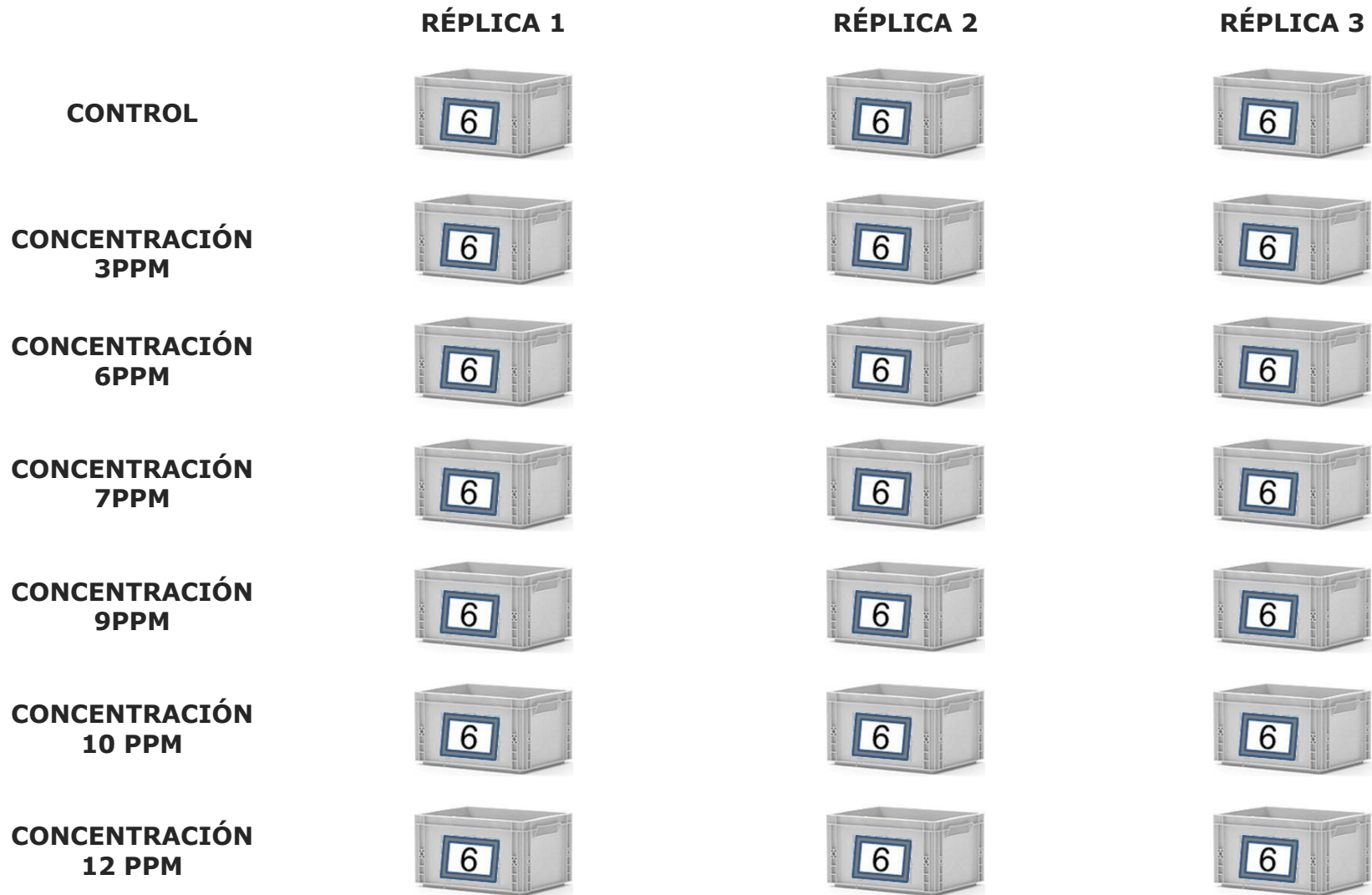


Figura 17. Esquematización de la cámara de bioensayo agudo a 72 horas

ESQUEMATIZACIÓN DE LA CÁMARA DE BIOENSAYO SUBCRÓNICO A 21 DÍAS

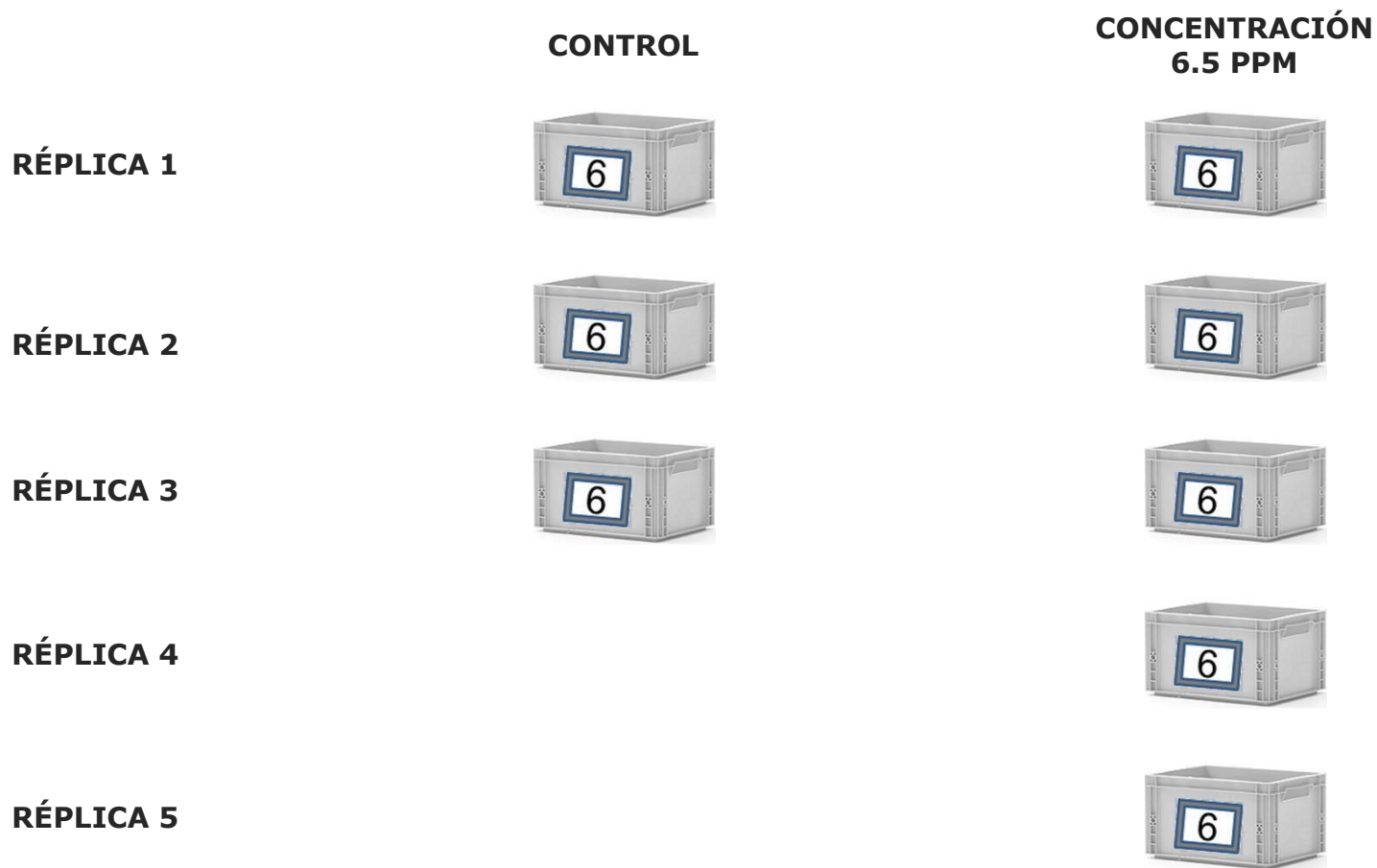


Figura 18. Esquemática de la cámara de bioensayo subcrónico a 21 días.

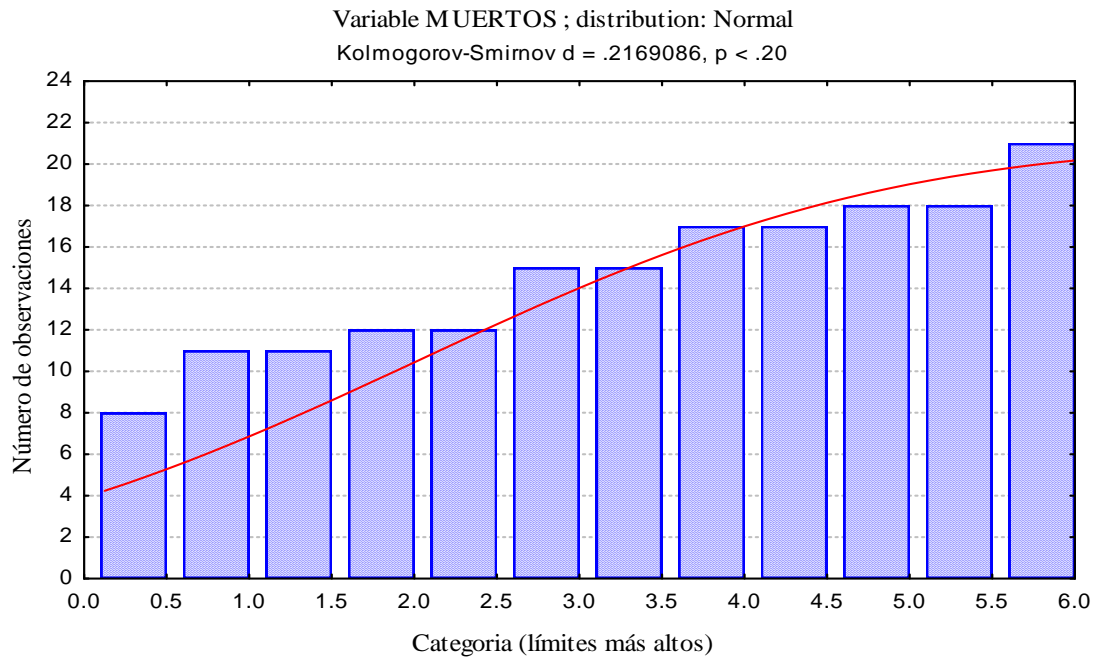


Figura 19. Distribución normal de la variable muertos, mediante Kolmogorov-Smirnov.

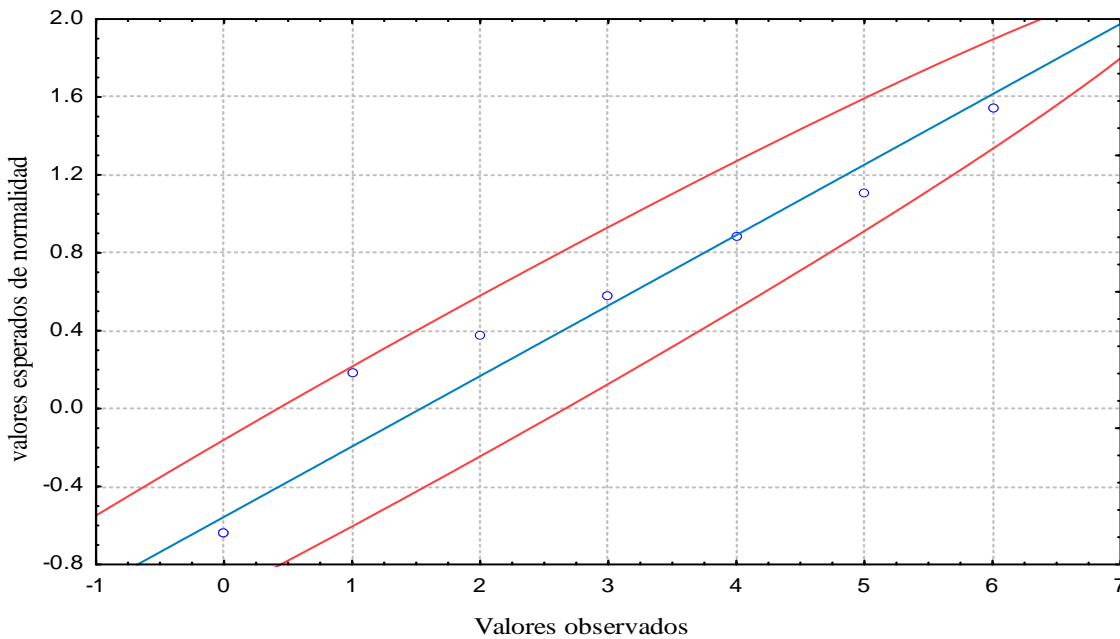


Figura 20. Variable muertos con valores esperados de normalidad dentro de la elipse de confianza (95 %).

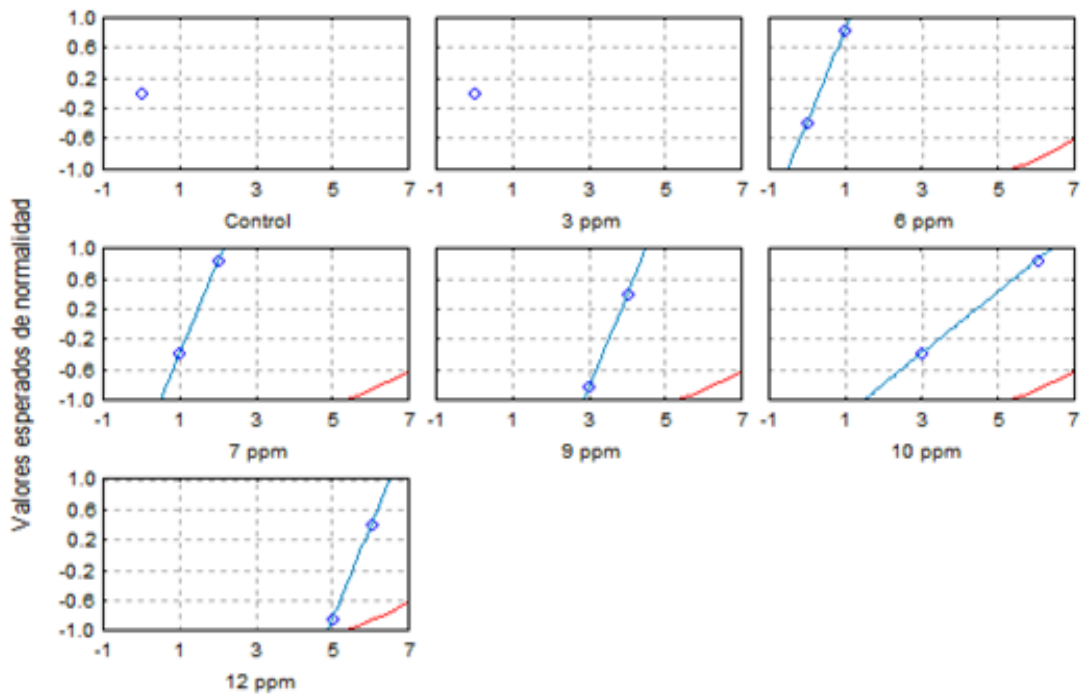


Figura 21. Normalidad de la variable muertos de acuerdo a las diferentes concentraciones de exposición.



Figura. 22. Herbicida del grupo químico Triazinas

Nombre comercial: GESAPAX[®] COMBI 80 PH

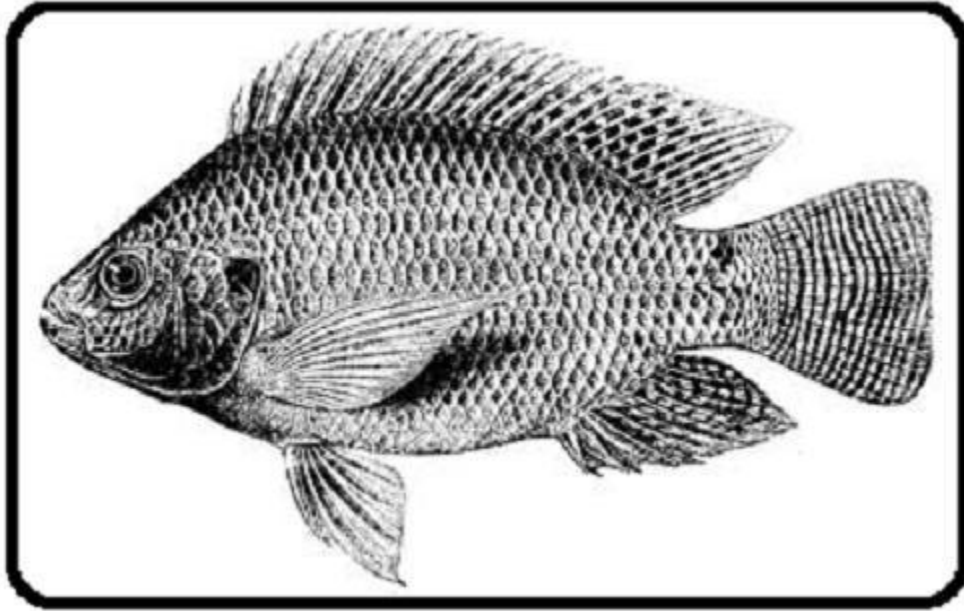


Figura 23. Especie de prueba (Dibujo tomado de Trewavas, 1983)

Orden: Perciformes

Familia: Cichlidae

Especie: *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758

Nombre común: Tilapia