

EFFECTO DEL AGUA DEL EMBALSE DE LA VEGA EN LA LIPOPEROXIDACIÓN Y LOS NIVELES DE LA ACETILCOLINESTERASA EN EL HÍGADO Y EL MÚSCULO DE *Xiphophorus helleri*

Liliana FAVARI PEROZZI¹, Miguel MADRIGAL ORTIZ² y Eugenia LÓPEZ LÓPEZ

¹ Sección Externa de Farmacología, CINVESTAV-IPN. Apdo. Postal 14-740, México 07300 D.F.
lfavari@mail.cinvestav.mx

² Universidad de Guadalajara. Av. Juárez 976, Guadalajara, Jalisco.

³ Laboratorio de Ictiología y Limnología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Carpio y Plan de Ayala. Col. Sto. Tomás, México 11341 D.F., elopezl@encb.ipn.mx

(Recibido octubre 2002, aceptado agosto 2003)

Palabras clave: embalse, contaminación, industria azucarera, peces, insecticidas, organofosforados, biomarcadores

RESUMEN

La descarga de contaminantes provenientes de las industrias representa un serio problema de contaminación acuática debido a que reducen la calidad del agua y son peligrosos para la población de peces. El río Ameca, localizado en la vertiente del Pacífico del oeste de México, está caracterizado por la presencia de manantiales y del embalse De La Vega que recibe aguas residuales de la industria azucarera. La respuesta biológica a la contaminación ambiental medible en un organismo ha sido considerada como la respuesta de un biomarcador. El objetivo del presente estudio fue analizar las características fisicoquímicas del agua del embalse De La Vega y el efecto tóxico de dichas aguas. Los bioensayos se realizaron en *Xiphophorus helleri* para determinar los efectos de una exposición corta (96 h) a las aguas del embalse De La Vega, mediante dos biomarcadores: la acetilcolinesterasa (AChE) y la lipoperoxidación (LP). Después de la aclimatación, los peces fueron divididos en tres grupos y cada uno (n=8) fue expuesto al agua de cada sitio, N, C y S, respectivamente. Los peces del grupo testigo (n=8) se mantuvieron en agua reconstituída. En el embalse se detectaron marcadas fluctuaciones en los factores fisicoquímicos con gradientes verticales y fluctuaciones estacionales como ocurrió con el oxígeno disuelto, la conductividad, la turbidez, los nitratos y los nitritos, en el sitio S. La actividad de la acetilcolinesterasa fue inhibida en el hígado y en el músculo de los peces expuestos, la inhibición fue del 86, 88 y 89 % en el hígado, en los sitios N, C y S, respectivamente, después de 96 h de exposición a las aguas del embalse comparado con los valores de los testigos pero la mayor inhibición fue observada en el músculo. Los peces expuestos al agua del embalse también mostraron el aumento significativo en la LP medida con el método de las sustancias reaccionantes con ácido tiobarbitúrico (TBARS), comparado con los testigos. El tratamiento llevó a un incremento de 1.5, 2.5 y 4 veces en la LP en hígado y en músculo 2, 1.3 y 3.5 veces correspondiente a N, C y S, respectivamente. También se observó incremento de los dienos conjugados. La exposición al agua causó el aumento del 100 % en el nivel de los dienos conjugados en los homogeneizados de hígado y músculo. Los resultados obtenidos indican que los peces expuestos a varios contaminantes presentes en el agua del embalse fueron vulnerables a estos. Aunque *X. helleri* es una especie tolerante, la exposición a varios contaminantes puede conducir a una alteración de las actividades reproductoras y a cambios en el tamaño y en la estructura de la población de la especie.

Key words: reservoir, contamination, fish, sugar industry, organophosphorus insecticides, biomarkers

ABSTRACT

The discharge of pollutants by industries represents a serious water contamination problem because the contaminants reduce the quality of freshwater and are hazards to the fish population. The Ameca river, located in the Pacific slope of western México is characterized by the presence of springs and a reservoir (De La Vega reservoir). This reservoir receives sewage from the sugar industry. The measurable biological response of an organism to environmental contamination has been termed a biomarker response. The aim of the present study was to investigate the physicochemical characteristics of De La Vega water and the toxic effect of this water. Bioassays were performed in *Xiphophorus helleri* to determine the effects of a short-term exposure (96 h) to water of De La Vega reservoir on two biomarkers: acetylcholinesterase (AChE) and lipid peroxidation (LP). After acclimatization, the fish were divided into three groups and each group (n=8) was exposed to water of each site, N, C, and S, respectively and the control group (n=8) was maintained in reconditioned water that served as control. In the reservoir there was possible to detect marked fluctuations in the physicochemical factors both with vertical gradients and seasonal fluctuations as occurred with dissolved oxygen, conductivity, turbidity, nitrates and nitrites, on site S. Acetylcholinesterase activity was inhibited in the liver and muscle of exposed fish. There was a 86, 88 and 89 % inhibition of AChE activity in the liver, at N, C and S sites, respectively, after 96 h exposure to reservoir waters compared to control values but the highest AChE inhibition was observed in muscle. Fish exposed to reservoir water also demonstrated a significant increase in LP measured as the amount of TBARS as compared to controls. Water treatment led to 1.5, 2.5 and 4 fold in increase in LP liver and in muscle 2, 1.5 and 3.5 fold corresponding to N, C and S, respectively. Also, the conjugated dienes showed an increase. The water exposure caused a 100 % increase in the level of conjugated dienes in the liver and muscle homogenates. The results reported here indicate that fish subjected to a exposure of combined contaminants of De La Vega water are vulnerable to the toxic effect of them. Although *X. helleri* is a tolerant species, exposure to levels of pollutants may lead to the impairment of the reproductive activities and changes in either the population size and structure of this species.

INTRODUCCIÓN

Las descargas de aguas residuales, industriales y domésticas que se vierten directamente a los ríos, embalses y lagos, además el deterioro de las cuencas hidrográficas que por lavado y escurrimiento de su superficie acarrear mayores aportes, han provocado que estos sistemas se encuentren en un proceso de envejecimiento (De la Lanza-Espino y García-Calderón 1995).

La protección de los ecosistemas acuáticos de los efectos adversos de los compuestos liberados por el hombre es de gran importancia ya que estos ecosistemas son muy valiosos en términos económicos y recreacionales así como en diversidad genética ya que esta es la base para los cambios evolutivos y de las adaptaciones de las poblaciones que pueden perderse por efecto de los contaminantes (Sturm y Hansen 1999). Además, estos xenobióticos pueden cambiar parámetros limnológicos limitando el desarrollo de las comunidades acuáticas y provocando la migración, desaparición y extinción de las especies (Schaeffer 1991).

El río Ameca, localizado en la vertiente del Pacífico (Jalisco), es considerado un centro de endemismo de peces caracterizado por la presencia de familias de godeidos, atherinópsidos, catostómidos, pecílidos y ciprínidos (Miller y Smith 1986).

La urbanización y los desechos provenientes del desarrollo industrial de la región del río han degradado la calidad del agua y como resultado la biota ha sufrido estrés ambiental. Por esto, deben conocerse las características físicas y químicas del agua para darle un uso óptimo. López-López y Paulo-Maya (2001) encontraron que el río Ameca tiene síntomas biológicos de estrés que incluyen la tendencia a la reducción de especies de peces endémicos, el aumento de la dominancia de especies exóticas y la reducción de la estabilidad poblacional, debido a numerosos factores, entre ellos las contaminaciones municipal, agrícola e industrial, especialmente de la industria azucarera.

La necesidad de detectar y determinar el impacto de la contaminación, principalmente de bajas concentraciones de mezclas de contaminantes en ecosistemas ha llevado al estudio y al desarrollo de indicadores de efectos biológicos en organismos. Los biomarcadores bioquímicos y fisio-

lógicos son usados frecuentemente para detectar o diagnosticar efectos subletales en peces expuestos a efluentes y a sustancias tóxicas (Adams *et al.* 1992, Soimasuo *et al.* 1995, López-López *et al.* 2003). El uso de biomarcadores tempranos para estimar la exposición o los efectos resultantes de los contaminantes y que adviertan sobre grados de exposición capaces de ocasionar situaciones de tipo irreversible son muy útiles para una evaluación rápida de la salud de los organismos acuáticos (López-Barea 1995) y debido a esto el uso de bioensayos subletales se vuelve relevante.

En este trabajo se analizaron las condiciones ambientales del embalse De La Vega y el efecto tóxico del agua del embalse en la especie *Xiphophorus helleri*, empleando la actividad enzimática de la AchE y la lipoperoxidación como biomarcadores. Esta especie habita la cuenca y alcanza densidad poblacional alta por lo que se supone que se trata de una especie tolerante.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de Estudio

La parte alta del río Ameca se caracteriza por la presencia de manantiales. El embalse De La Vega se localiza a 5 km aguas abajo y la cortina del mismo está localizada a 9.5 km al sur del poblado de Teuchitlán. El embalse tiene varios tributarios: del norte recibe las descargas municipales de este poblado y en el sureste

descarga el río Salado con las aguas provenientes de un ingenio azucarero (Fig. 1).

En la ciudad de Ameca, 15 km aguas abajo del embalse, el río Ameca recibe las aguas municipales de aquella ciudad y las descargas de una segunda industria azucarera. Bajo estas circunstancias, el río no posee biota aeróbica. El embalse está muy contaminado y es una barrera para la dispersión de los peces. Sólo los manantiales ofrecen las condiciones apropiadas para los peces (López-López y Paulo-Maya, 2001).

La región circundante al embalse presenta terrenos de uso agrícola por lo que es común el empleo de insecticidas y herbicidas que en la época de lluvias se escurren hacia el embalse y los manantiales donde habitan los peces.

Características fisicoquímicas del agua

Las muestras de agua se tomaron mensualmente de junio 1996 a marzo 1997 en tres sitios del embalse, N, C y S, este último está próximo a la cortina del embalse donde la profundidad (7 m) permitió obtener gradientes verticales de los parámetros fisicoquímicos. La poca profundidad de los sitios N y C impidió obtener parámetros fisicoquímicos, por lo que los gradientes corresponden al sitio S (Fig. 1). En cada sitio de estudio se registraron la temperatura del agua, el oxígeno disuelto y la conductividad mediante el uso del multisensor YSI modelo 85 con electrodos para la medición de temperatura. El pH se midió mediante un potenciómetro marca Corning

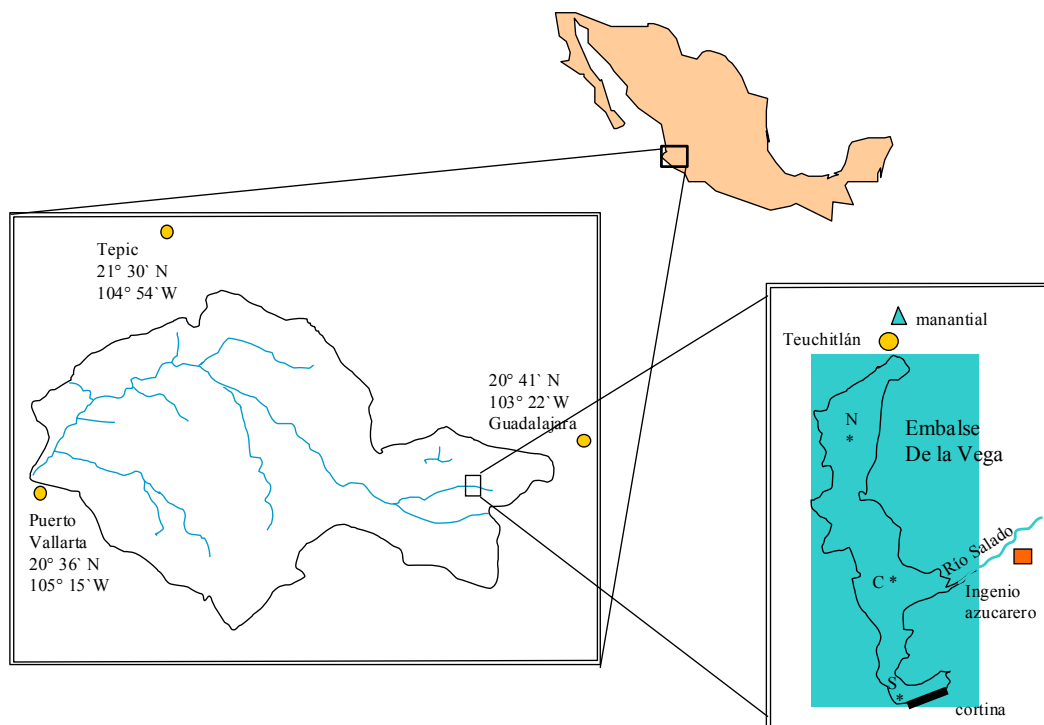


Fig. 1. Localización del embalse De La Vega y de los sitios N, C y S.

modelo 130. En las muestras de agua se determinaron la concentración de nitratos, nitritos, amoníaco, fósforo total (P_T), sulfatos y turbiedad y el metal hierro (Fe) para el sitio S durante el ciclo de 10 meses y para los sitios N y C del mes de julio mediante el espectrofotómetro marca Hach modelo DRL 2000. Asimismo, se midieron los mismos parámetros en las aguas del manantial "El Rincón", que no recibe aguas municipales pero sí escorrentías durante la época de lluvias.

Bioensayos

Los peces colectados en el mes de julio de 1996 (período de lluvias), en el manantial "El Rincón" se aclimataron durante 15 días en un acuario con agua reconstituida con las siguientes características: dureza 150 mg/L (como $CaCO_3$), alcalinidad 31 mg/L (como $CaCO_3$), oxígeno disuelto 12 mg/L y pH 8.2, con aireación constante y temperatura de 22 ± 1 °C. La longitud de los peces que se utilizaron en los bioensayos fue de 40 a 50 mm y el peso de 15 a 20 g.

Se tomó agua del embalse de La Vega en tres sitios diferentes N, C y S, en el mes de julio y se determinaron en ellas las concentraciones de insecticidas organofosforados (OF) mediante cromatografía de gases, con el cromatógrafo de gases marca Varian modelo 3400 de acuerdo con la técnica de Gluckman *et al.* (1986) y Stan (1989).

Los bioensayos se llevaron a cabo de la siguiente manera (EPA 1993): tres lotes constituidos por 8 peces de la especie *Xiphophorus helleri* se expusieron a 25 L de agua de cada sitio de estudio, N, C y S. En otro acuario con 25 L de agua reconstituida se colocaron 8 peces de la misma especie que sirvieron como testigo (T). Se mantuvo la temperatura del agua de todos los acuarios a 22 ± 1 °C. El período de exposición fue de 96 horas, sin recambio de agua pero con aireación constante.

Biomarcadores

Al terminar la exposición, se sacrificaron a los peces mediante un corte en el opérculo. Se disectaron los hígados y los músculos de los 24 peces utilizados y se homogeneizaron con amortiguador Tris-HCl pH=7.0.

En los homogeneizados totales de hígado y músculo se determinaron los grados de lipoperoxidación mediante la técnica TBARS (sustancias reaccionantes con MDA (malondialdehído)) (Buege y Aust 1978), es decir se determinó el MDA resultante de la lipoperoxidación mediante la reacción con el ácido tiobarbitúrico. Se pesaron 0.5 g de hígado y músculo y se homogeneizaron con 5 ml de agua tridestilada. Se tomaron 300 μ l de cada homogeneizado y se agregaron 700 μ l de Tris-HCl 150 mM, pH 7.4. Se incubó a 37 °C por 30 minutos. Terminada la incubación se agregaron 2 ml de ácido tiobarbitúrico 0.375 % disuelto en ácido tricloroacético al 15 %. Se calentó a ebullición durante 45 minutos. Se

centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se leyó el sobrenadante en un espectrofotómetro marca Beckman modelo DU-7. Los resultados se expresaron como los nmol MDA por mg de proteína total de los homogeneizados de hígado y músculo. Además, se estimó la lipoperoxidación mediante el método de los dienos conjugados descrito por Recknagel y Glende (1984). A un g de los homogeneizados de los animales testigos y experimentales se agregaron 7 mL de metanol y 14 mL de cloroformo. Se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 260 g durante 10 minutos para obtener la sedimentación del material insoluble. El sobrenadante se ajustó a un volumen final de 30 mL con cloroformo: metanol (2:1, v:v). Se adicionaron 10 ml de agua, se mezcló por inversión y se centrifugó nuevamente a la misma velocidad y tiempo anteriores. Se aspiró la fase metanol-agua. Se tomaron 2 ml de la fase clorofórmica y se colocaron en un baño de agua a 40 °C eliminando el cloroformo bajo una corriente de nitrógeno. Se agregaron 3 mL de ciclohexano y se midió la absorción de los dienos conjugados contra un blanco de ciclohexano a 233 nm en un espectrofotómetro marca Beckman modelo D-650.

Una parte de los homogeneizados de hígado y músculo se centrifugó a 3500 rpm y los sobrenadantes se utilizaron para determinar la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) por el método de Hestrin (1949). A 1 mL del sobrenadante se adicionaron 2 mL de Tris-HCl 0.02 N pH=7.0 y 1.0 ml de acetilcolina (8 μ moles / mL) y se incubó a 25 °C durante 20 minutos. Después de la incubación la reacción fue suspendida agregando 1.0 ml de hidroxilamina alcalina 2 M, 1.0 mL de ácido clorhídrico 4 N y 1.0 mL de cloruro férrico 0.37 M disuelto en ácido clorhídrico 0.1 N. El color desarrollado se leyó a 540 nm en un espectrofotómetro marca Beckman modelo DU-7.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) que utiliza albúmina bovina sérica como estándar. A 20 μ l del homogeneizado al 10 % se agregaron 80 μ l de agua tridestilada y 2.4 mL del reactivo formado por 100 mL de ácido fosfórico 85 %, 50 mL de alcohol etílico 96 % y 100 mg de azul de Coomassie G-250 aforado a 1.0 L con agua. Se preparó un blanco con 100 μ l de agua e igual volumen del reactivo. Se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro marca Beckman modelo DU-7. Previamente, se preparó una curva de calibración utilizando albúmina bovina sérica. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

A los resultados se les hizo el análisis de variancia de una vía seguido por el método de las comparaciones múltiples de Tukey (Zar 1984). Las diferencias se consideraron significativas a $p < 0.05$.

RESULTADOS

Características fisicoquímicas del agua

En julio, en el agua del embalse se encontraron insecticidas OF con las concentraciones siguientes: malatión 4.25 ± 0.17 mg/L, metil paratión 2.76 ± 0.30 mg/L y clorpirifos 6.83 ± 0.78 mg/L. Las concentraciones de organofosforados se tomaron en los sitios N, C y S y en otros cinco cercanos a estos y fueron muy similares para todos ellos.

En la **tabla 1** aparecen los parámetros fisicoquímicos del agua de los sitios N y C, del mes de julio y se notaron algunas diferencias. Las concentraciones de oxígeno disuelto, nitratos, nitritos y amoníaco fueron menores en el sitio C; en cambio, en el mismo sitio, los valores de pH, turbiedad, conductividad y P_T fueron mayores que los del sitio N. La temperatura y las concentraciones de los sulfatos y del hierro alcanzaron valores semejantes en los dos sitios.

TABLA I. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS SITIOS N Y C EN EL EMBALSE DE LA VEGA EN EL MES DE JULIO

PARÁMETROS	SITIOS	
	N	C
Temperatura (°C)	27.0	26.5
Oxígeno (mg/L)	6.2	5.0
pH	7.4	8.1
Turbiedad (UFT)	89.0	114.0
Conductividad (mS/cm)	0.43	1.23
Nitratos (mg/L)	1.0	0.5
Nitritos (mg/L)	0.071	0.030
Amoníaco (mg/L)	0.98	0.63
Sulfatos (mg/L)	36.0	38.0
Fósforo total (mg/L)	1.40	2.15
Hierro (mg/L)	0.78	0.77

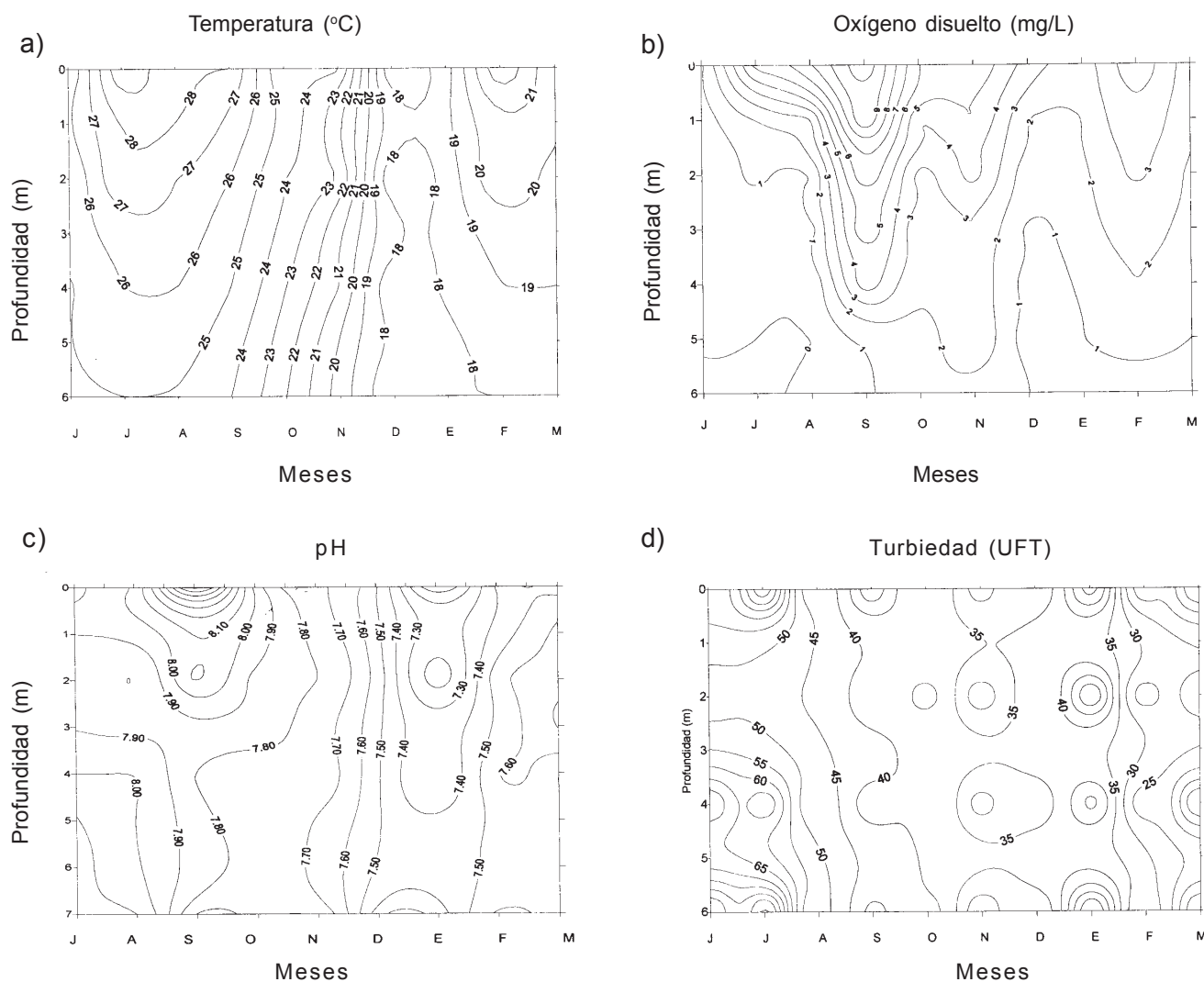


Fig. 2. Diagrama profundidad-tiempo del sitio S del embalse De La Vega, de julio 1996 a marzo 1997. a) temperatura, b) oxígeno disuelto, c) pH y d) turbiedad.

En la **figura 2a** se muestran las isotermas del embalse. Se presentó un gradiente térmico de abril a agosto, de la superficie al fondo con diferencia de 5 °C que se rompió a partir de agosto en que las temperaturas disminuyeron hasta enero, la temperatura en la columna de agua se mantuvo igual en la superficie y en el fondo. De enero a marzo se observó el incremento de 1 °C por cada mes.

El oxígeno disuelto mostró valores superficiales máximos de 10 mg/L, de julio a octubre pero disminuyeron de noviembre a marzo, alcanzando 5 mg/L (**Fig. 2b**). En el fondo, se observaron condiciones anóxicas con excepción de los meses de octubre, noviembre y diciembre. En los manantiales, el oxígeno disuelto fluctuó de 6 a 8 mg/L.

El pH presentó valores de 7.5 a 8.5. Los valores más bajos se mostraron en noviembre y diciembre y los mayores,

en julio y agosto (**Fig. 2c**). A partir de diciembre, el pH fue de 7.5 y 8.0 a partir de julio, pero siempre fueron mayores a 7.0. A pesar de la anoxia encontrada en el fondo, el pH se mantuvo por arriba de 7.0, de noviembre a marzo. En los manantiales el valor promedio del pH 7.4 fue menor al del embalse.

La turbiedad mostró un gradiente con los valores más altos (60 y 90 UFT en el fondo) en los meses de lluvia (junio y julio) y con los valores menores (30 UFT) en febrero y mayo (**Fig. 2d**). En los manantiales se observaron valores bajos de la turbiedad, entre 0 y 7 UFT.

Se encontraron fluctuaciones en la conductividad que mostraron un gradiente con valores altos en el fondo de 0.80 mS/cm en junio, julio y agosto. Sin embargo, la columna de agua fue homogénea desde septiembre a

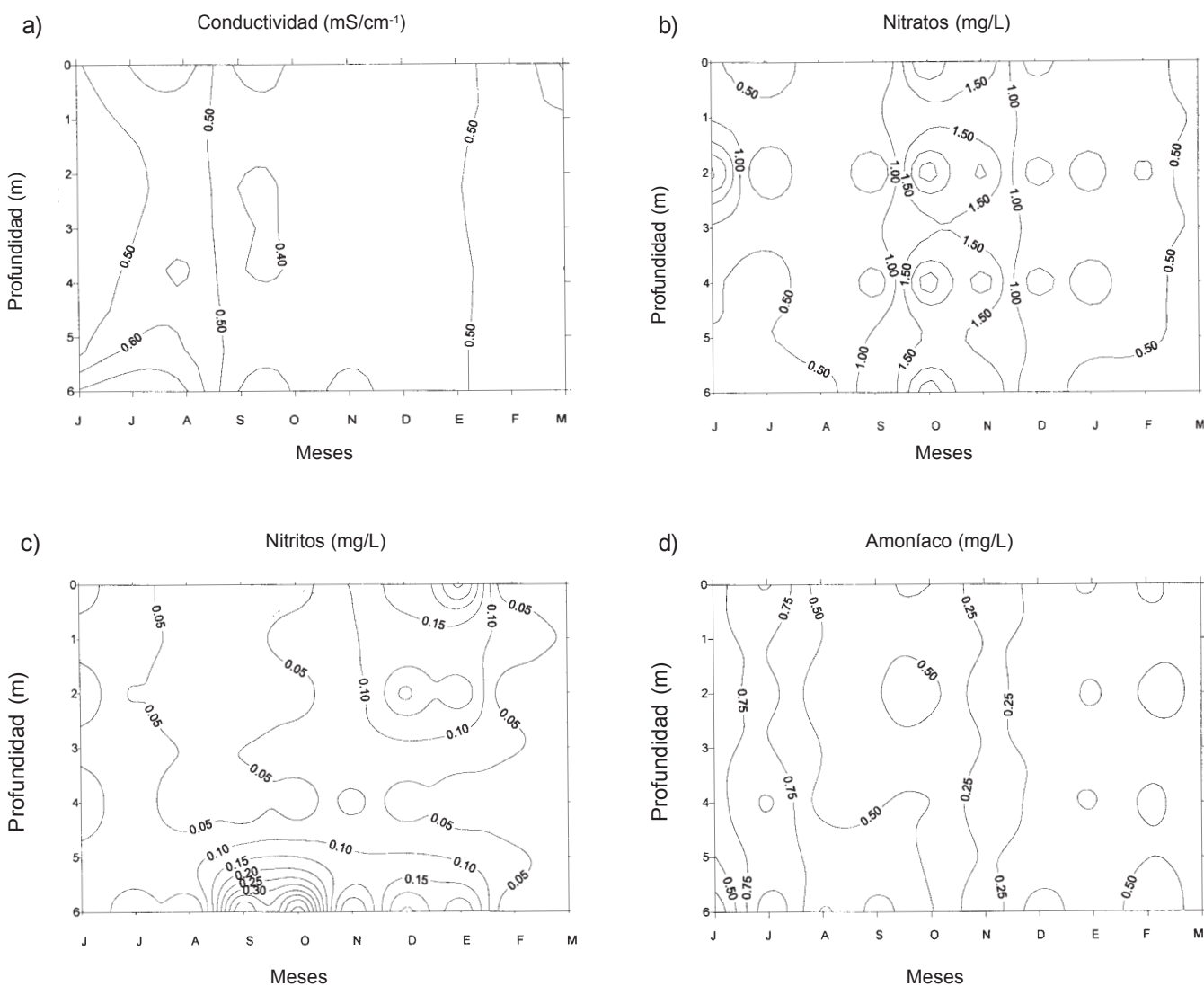


Fig. 3. Diagrama profundidad-tiempo del sitio S del embalse De La Vega, de julio 1996 a marzo 1997. a) conductividad, b) nitratos, c) nitritos y d) amoníaco.

marzo (**Fig. 3a**). En los manantiales, la conductividad alcanzó valores menores a los del embalse, de 0.18 a 0.45 mS/cm.

La **figura 3b** presenta las isopletas de nitratos en mg/L durante el ciclo de 10 meses. El nitrato tuvo un pequeño gradiente con valores que se incrementaron a partir de los 2 m y disminuyeron hacia el fondo. De septiembre a diciembre no se encontró un gradiente en la columna de agua pero aumentó la concentración de nitrato de octubre a noviembre (de 1.00, a 1.50 y 2.00 mg/L) para luego disminuir hasta 0.50 mg/L. Los valores de nitratos de los manantiales fueron similares a los del embalse De La Vega.

Los nitritos aumentaron su concentración en el fondo durante septiembre y octubre (0.10 a 0.50 mg/L). En diciembre y enero, la columna de agua mostró un gradiente doble desde los 4 m de profundidad hacia la superficie y el fondo (**Fig. 3c**). En los manantiales, los nitritos alcanzaron concentraciones menores, con valores promedio de 0.0075 mg/L.

El amoníaco tuvo fluctuaciones pequeñas en la columna de agua, durante el periodo estudiado. De junio a octubre se encontraron valores altos de 0.50 mg/L pero de noviembre a marzo fueron más bajos (**Fig. 3d**). En el manantial, se detectaron valores de amoníaco entre 0 y 0.24 mg/L.

La columna de agua del embalse no mostró gradientes verticales de sulfatos pero en un largo periodo, de julio a diciembre se mantuvieron valores altos de 20 a 40 mg/L. Febrero y marzo mostraron los valores menores (10 a 15 mg/L) (**Fig. 4a**). En el manantial, los valores de sulfatos se encontraron en el intervalo de 1 a 25 mg/L.

Las isopletas de fósforo total (P_T) se muestran en la **figura 4b**. En septiembre y octubre los valores de la superficie y del fondo fueron iguales (0.5 y 1.0 mg/L). Estos aumentaron a 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L en diciembre y enero, pero fueron iguales en la superficie y en el fondo. En febrero y marzo aumentó la concentración de P_T a 3.0 mg/L, manteniéndose los valores iguales en superficie y fondo. En el manantial, el P_T alcanzó valores entre 0.005 a 0.23 mg/L.

De junio a septiembre los valores del Fe disminuyeron de 0.70 a 0.40 mg/L, de la superficie hasta los 3.5 m. A partir de esta profundidad los valores aumentaron de 0.40 a 0.70 mg/L. En enero y febrero estos disminuyeron de 0.40 a 0.20 mg/L pero se mantuvieron iguales en superficie y fondo (**Fig. 4c**). La concentración de Fe obtenido en el manantial fue de 0.03 mg/L.

Biomarcadores

Se encontraron diferencias significativas entre la actividad de la AchE en el hígado y en el músculo de *Xiphophorus helleri* con respecto al testigo (**Fig. 5**). Los valores testigo de la AchE fueron 0.040 ± 0.008 nmol/mg/min⁻¹ para el hígado y 0.065 ± 0.009 nmol/mg/min⁻¹ para el músculo. En el hígado, en el sitio N la inhibición de

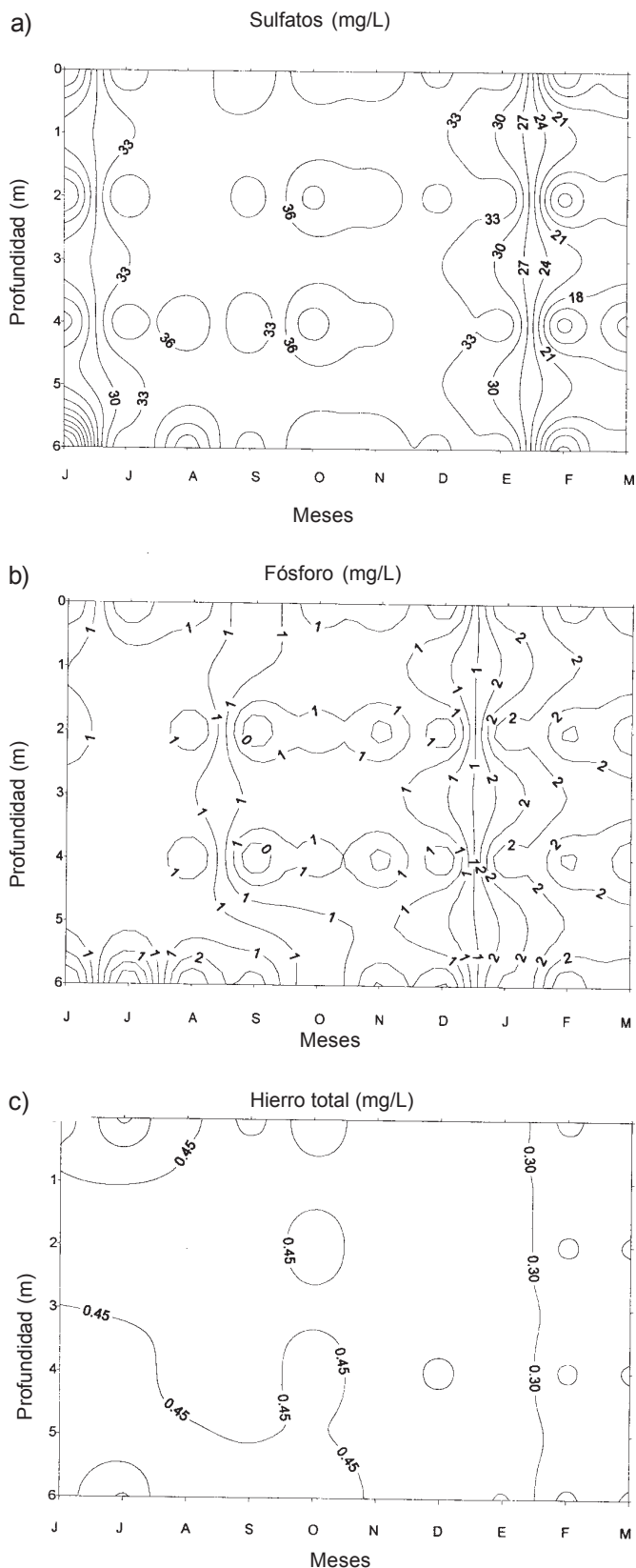


Fig. 4. Diagrama profundidad-tiempo del sitio S del embalse De La Vega, de julio 1996 a marzo 1997. a) sulfatos, b) fósforo y c) hierro total.

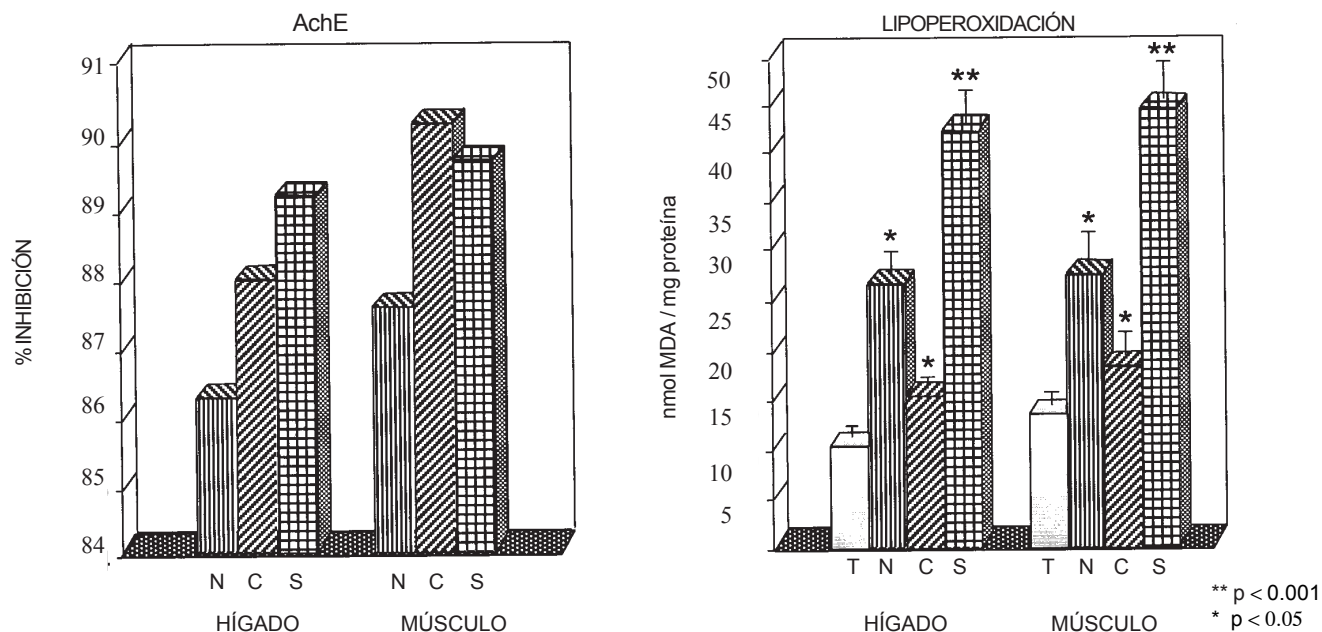


Fig. 5. Efecto del agua de los tres sitios del embalse de la Vega en los niveles de acetilcolinesterasa y la lipoperoxidación de *X. helleri*

la AchE fue de 86 % (0.0056 ± 0.0002 nmol/mg/min⁻¹) mientras que en el C fue del 88 % (0.0048 ± 0.001 nmol/mg/min⁻¹) y la mayor, 89 % se obtuvo en el sitio S. En el músculo, la más alta se encontró en el sitio C (90 %) y, como ocurrió en el hígado, la menor se obtuvo en el N (87.5 %). La inhibición de la AchE fue mayor en el músculo que en el hígado.

En el sitio S se obtuvieron los máximos valores de lipoperoxidación en el músculo y en el hígado, 45.0 y 41.0 nmol MDA/mg de proteína, respectivamente (**Fig. 5**). Asimismo, se observó la duplicación de los valores de los dienos conjugados en los peces expuestos al agua del embalse, obteniéndose los valores más altos en el sitio S, tanto en el hígado como en el músculo (**Tabla II**).

DISCUSIÓN

A pesar de la anoxia encontrada de noviembre a marzo, el pH se mantuvo por arriba de la normalidad, la alta mineralización del embalse y los contaminantes que allí se encuentran, probablemente provocaron el aumento del pH. La presencia de oxígeno disuelto controla el estado redox de muchos elementos de importancia en la dinámica y producción lacustre como en el caso del C (carbono), N (nitrógeno), P, Fe y S (azufre). El P es frecuentemente el nutriente limitante para la producción fitoplanctónica. En el embalse De La Vega, la concentración de P fue muy alta y no homogénea a través del mismo (Salas y Limón 1986). Además, el embalse De La Vega tiene una concentración promedio alta de sulfatos (15 a 35 mg/L). Estos presentan interacciones con el Fe y los fosfatos.

Al reducirse los sulfatos a sulfuros por la acción de las bacterias sulforreductoras, el sulfuro es capaz de reducir al Fe y formar sulfuro de Fe, en condiciones anaeróbicas. Asimismo, como los fosfatos se mantienen como fosfatos de Fe insolubles en los sedimentos, la formación de sulfuro de Fe puede conducir a la liberación de P soluble (Wetzel 2001), aumentando así la concentración de P en la columna de agua. En ninguno de los meses del ciclo de estudio se detectó el agotamiento de sulfatos en el hipolimnion conjuntamente con la anoxia, por lo que la posibilidad de reducción de sulfatos a sulfuros fue escasa y la posible liberación de P de los sedimentos también fue mínima. Por otro lado, la presencia de sulfuros en el hipolimnion aún sin concentración de oxígeno disuelto sugiere la presencia de una microzona de oxidación en los sedimentos.

TABLA II. EFECTO DEL AGUA DE LOS SITIOS N, C Y S DEL EMBALSE DE LA VEGA EN EL NIVEL DE DIENOS CONJUGADOS

Grupo	Hígado ΔA_{233} / mg		
	N	C	S
Testigo	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01
tratado	*0.60 ± 0.03	*0.62 ± 0.03	*0.70 ± 0.04
	Músculo ΔA_{233} /mg		
Testigo	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02
tratado	*0.65 ± 0.03	*0.58 ± 0.03	*0.74 ± 0.05

Los valores se expresan como la media \pm DS de 8 animales diferentes determinados por triplicado.

* Significativamente diferente del grupo testigo, $p < 0.05$.

El amoníaco, los nitritos y los nitratos están presentes en los ecosistemas dulceacuícolas como productos de la degradación biológica normal de proteínas y ácidos nucleicos. Los tres compuestos de N pueden entrar al ecosistema por escurrimientos de la agricultura, desechos industriales y efluentes cloacales (Camargo y Ward 1995). Así, concentraciones altas de nitrato se encuentran en las aguas como consecuencia de la contaminación, como en el embalse De La Vega. El nitrato está considerado el menos tóxico que otras formas de N como amoníaco y nitrito para los organismos acuáticos (Russo 1985). En estudios de toxicidad crónica Knepp y Arkin (1973) encontraron que la concentración de 96 ppm de nitrato fue tolerada por *Ictalurus punctatus* y *Micropterus salmoides* sin afectar su crecimiento y su alimentación. La descomposición de la materia orgánica resulta en la liberación y la acumulación de amoníaco. En condiciones aeróbicas el amoníaco es oxidado a nitrato, pero en condiciones anaeróbicas la nitrificación del amoníaco a nitrato no ocurre y el primero se acumula en el fondo del cuerpo de agua. Mientras el nitrato está disponible, el potencial redox permanece más alto que el requerido para la reducción del hierro y subsecuentemente se libera el P del complejo fosfato férrico en los sedimentos. El aumento de la nitrificación del amoníaco a nitrato y su uso posterior en la desnitrificación estabiliza el potencial redox y reduce la carga interna del fósforo (Kortmann y Rich 1994).

La inhibición de la AchE en el tejido cerebral o en otros órganos como sangre, ojo, hígado y músculo está considerada como el biomarcador específico más sensible del efecto de los insecticidas carbámicos y organofosforados en peces de agua dulce y marinos (Bastos *et al.* 1991, Grue *et al.* 1997, Sturm *et al.* 1999).

La inhibición de la enzima no permite la hidrólisis de la acetilcolina en ácido acético y colina, dando lugar a una transmisión prolongada de impulsos que provocan una sobrestimulación de las células nerviosas que puede resultar en tétano, fallo respiratorio y muerte (Ecobichon 1991).

Por otro lado, existen evidencias que indican que la salud de los organismos acuáticos está ligada al estrés oxidante que es experimentado por todos los organismos aeróbicos cuando hay un desbalance entre las sustancias prooxidantes y las antioxidantes y en el cual predominan las primeras (Stegeman *et al.* 1992). Los procesos complejos que acompañan al estrés oxidante resultan en el daño a diversos componentes celulares, la descomposición peroxidante de los lípidos membranosos (lipoperoxidación) y los cambios asociados en las propiedades de las membranas. Una de las consecuencias del incremento del estrés oxidante es el aumento de la lipoperoxidación (Muriel 1997). La lipoperoxidación es un proceso complejo que involucra la formación de radicales lipídicos entre el oxígeno

molecular y los ácidos grasos insaturados, la propagación de estos, el rearrreglo de las dobles ligaduras en los lípidos insaturados que da origen a dienos conjugados y la destrucción de los lípidos membranosos (Buege y Aust 1978). La lipoperoxidación da lugar a numerosos productos derivados de la descomposición lipídica: alcoholes, cetonas, éteres y aldehídos como el MDA de fácil valoración (Dubin *et al.* 1987).

El aumento de la lipoperoxidación puede indicar que los contaminantes presentes en el embalse De La Vega estimularon la generación de radicales libres y además, inhibieron las sustancias antioxidantes captadoras de estos así como al sistema antioxidante de defensa siendo particularmente importantes en éste, la glutatión S-transferasa y la glutatión peroxidasa por estar involucradas en la protección contra la toxicidad de los xenobióticos y en el estrés oxidante (Chasseaud 1979).

Las repercusiones del deterioro ambiental presente en el embalse De La Vega se manifestaron en la especie *X. helleri* por las alteraciones de la actividad enzimática de la AchE y el grado de lipoperoxidación, en todos los sitios estudiados, en especial en el S, cerca de la cortina donde confluyen los tributarios provenientes del ingenio azucarero y del poblado Teuchitlán. También los valores de los factores fisicoquímicos estudiados mostraron que es el sitio S el que reúne el mayor grado de degradación ambiental, seguido por el C ya que a este sitio llegan los efluentes del Rio Salado y del ingenio azucarero. Por otro lado, todos los peces intoxicados con los insecticidas OF presentes en el agua del embalse De La Vega mostraron hiperactividad y pérdida del equilibrio además de nadar en espiral pero todos sobrevivieron al período de exposición de 96 horas. De persistir la presencia de organofosforados en las concentraciones encontradas e incluso mayores, ya que en la zona son muy utilizados, los peces podrían morir debido a sus efectos neurotóxicos.

La cuenca tenía veinte especies nativas y seis introducidas, muchas de las cuales fueron encontradas o descritas en la última década. López-López y Paulomaya (2001) observaron el 70 % de reducción en la biodiversidad de peces; la parte alta de la cuenca contiene sólo seis especies nativas y cuatro exóticas por lo que se perdieron 14 especies nativas. *X. helleri* es una especie exótica y por los resultados obtenidos, tolerante, pero el efecto de la contaminación se evidenció por el cambio de la AchE y de la LP, por lo que esta especie podría ver comprometida una fase crítica de su ciclo de vida, por ejemplo la reproducción. Se sabe también que la exposición de los peces a los compuestos tóxicos afecta más profundamente al estadio larvario (Mc Kim 1985, von Westernhagen 1988) y las muertes de las larvas tendrían importantes implicaciones en el reclutamiento de las poblaciones adultas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la valiosa colaboración técnica de Ma. Teresa García Camacho.

REFERENCIAS

- Adams S.M., Crumby W.D., Greely M.S., Shugart L.R. y Saylor C.F. (1992). Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 24, 347-360.
- Bastos V.L.F.C., Bastos C., Lima J.S. y Faria M.C.V. (1991). Brain acetylcholinesterases as an in vitro detector of organophosphorus insecticides in water. *Wat. Res.* 25, 835-840.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Buege J.A. y Aust S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 53, 302-310.
- Camargo J.A. y Ward J.V. (1995). Nitrate NO₃-N toxicity to aquatic life: a proposal of safe concentrations for two species of nearctic freshwater invertebrates. *Chemosphere* 31, 3211-3216.
- Chasseaud L.F. (1979). The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Cancer Res.* 29, 175-274.
- De la Lanza-Espino G. y García-Calderón J.L. (1995). Presas de México, Centro de Ecología y Desarrollo, México, 147 p.
- Dubin M., Grinblat L., Fernández-Villamil S.H. y Stoppani A.O.M. (1987). Inhibición de la lipoperoxidación en microsomas de hígado por nifurtimox y nitrofurantoina. *Medicina (Buenos Aires)* 47, 342-350.
- Ecobichon D.J. (1991). Toxic effects of pesticides. En: Cassaret and Doull's *Toxicology: The basic sciences of poisons* (M.O. Amdur, J. Doull y C.D. Klaassen, Eds.). Pergamon Press, Nueva York, pp. 580-692.
- EPA (Environmental Protection Agency). (1993). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*, 4a. ed., 243 p.
- Gluckman J.C., Barceló D., De Jong G.C., Frei R.W., Maris F.A. y Brinkman U.A. (1986). Improved design and application of an on-line thermosonic detector for narrow bore liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 367, 35-44.
- Grue C.E., Gilbert P.L. y Seely M.E. (1997). Neurophysiological and behavioral changes in non-target wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticides: thermoregulation, food consumption and reproduction. *Am. Zool.* 37, 369-388.
- Hestrin S. (1949). Reaction of the acetylcholine and other carboxylic acids derivatives with hydroxylamine and its analytical application. *J. Biol. Chem.* 180, 249-261.
- Knepp G.L. y Arkin G.F. (1973). Ammonia toxicity level and nitrate tolerance of channel catfish. *Prog. Fish. Cult.* 35, 221-224.
- Kortmann R.W. y Rich P.H. (1994). Lake ecosystem energetics: The missing management link. *Lake Reserv. Manage.* 8, 77-97.
- López-Barea J. (1995). Biomarkers in ecotoxicology: an overview. *Arch. Toxicol.* 17, 57-79.
- López-López E. y Paulo-Maya J. (2001). Changes in the fish assemblages in the upper río Ameca, México. *J. Fresh. Ecol.* 16, 179-187.
- López-López E., Favari L., Martínez-Tabche L., Madrigal M. y Soto C. (2003). Hazard assessment of a mixture of pollutants from a sugar industry to three fish species of western México by the responses of enzymes and lipid peroxidation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 739-745.
- Mc Kim J.M. (1985). Early life stage toxicity tests. En: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. (G.M. Rand y S.R. Petrocelli, Eds.). McGraw Hill, Nueva York, Cap.3.
- Miller R.R. y Smith L.M. (1986). Origin and geography of the fishes of Central México. En: *Zoography of North American Freshwater Fishes* (C.R. Hocutt y E.O. Wiley, Eds.). Wiley, Nueva York, pp. 487-517.
- Muriel P. (1997). Peroxidation of lipids and liver damage. En: *Oxidants, antioxidants and free radicals*. (S.I. Baskin y H. Salem, Eds.). Taylor and Francis, Washington, pp. 237-239.
- Recknagel R.O. y Glende E.A. (1984). Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods Enzymol.* 105, 331-337.
- Russo R.C. (1985). Ammonia, nitrite and nitrate. En: *Fundamentals of aquatic toxicology* (G.M. Rand y S.R. Petrocelli, Eds.). Hemisphere Publishing Corporation, Washington, D.C. pp. 455-471.
- Salas H.J. y Limón J.G.M. (1986). Memorias del tercer encuentro del proyecto regional "Desarrollo de metodologías simplificadas para la evaluación de eutroficación en lagos cálidos tropicales". Guadalajara, Jalisco, México.
- Schaeffer D.J. (1991). A toxicological perspective on ecosystem characteristics to track sustainable development. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 22, 225-239.
- Stan H.J. (1989). Application of capillary gas chromatography with mass selective detector to pesticide analysis. *J. Chromatogr.* 467, 85-98.
- Stegeman J.J., Brouwer M., Di Giulio R.T., Förlin L., Fowler B.A., Sanders B.M. y Van Veld P.A. (1992). Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. En: *Biomarkers. biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress* (R.J. Huggett, R.A. Kimerle, P.M. Mehrle Jr. y H.L. Bergman, Eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, Vol. 6, pp 281-296.
- Sturm A., Da Silva de Assis H.C. y Hansen P.D. (1999). Enzymological characterisation and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Mar. Environ. Res.* 47, 389-398.
- Sturm A. y Hansen P.D. (1999). Altered cholinesterase and monooxygenase levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* exposed to environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42, 9-15.

- Soimasuo P., Jokins I., Kukkonen J., Petanen T., Ristola T. y Oikari A. Biomarker responses along a pollution gradient. Effects of pulp and paper mill effluents on caged whitefish. (1995). *Aquat. Toxicol.* 31, 329-345.
- von Westernhagen H. (1988). Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. En: *Fish physiology* (W.S. Hoar y D.J. Randall, Eds.). Academic Press, Nueva York, Vol. XI, Cap. 4.
- Wetzel R.G. (2001). *Limnology. Lake and river ecosystems*, Academic Press, Nueva York, 1006 p.
- Zar J.H. (1984). *Biostatistical Analysis*, Prentice Hall, Nueva Jersey, 718 p.