



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS  
DE HIDALGO**



**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS,  
CONSERVACIÓN Y MANEJO DE RECURSOS NATURALES**

**EFFECTO TÓXICO DE LOS NITRATOS EN ESPECIES  
DE PECES ENDÉMICAS DEL CENTRO DE MÉXICO**

**TESIS DOCTORAL**

Que presenta:

**M. en C. Ivette Marai Villa Villaseñor**

Para Obtener el Grado de  
Doctora en Ciencias Biológicas

Director: Dr. Omar Domínguez Domínguez

Codirectora: Dra. Esperanza Meléndez Herrera

**Comité Tutorial**

Dra. Beatriz Yáñez Rivera. ICML-UNAM.

Dr. Luis Humberto Escalera Vázquez. Facultad de Biología-UMSNH.

Dr. Rodolfo Pérez Rodríguez. Facultad de Biología-UMSNH.

Morelia, Michoacán. Octubre de 2023.

## DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a mi esposo Valentin y a mi hijo Eren Matteo, por toda su comprensión, paciencia y tiempo que me concedieron para la realización de esta tesis. La cual sin su apoyo, amor y sacrificio nunca se habría escrito. Por eso, este trabajo es también de ustedes.

**Valentin** tú has sido el motor que siempre me ha impulsado a salir adelante, a superarme y para que yo haya podido concluir esta etapa profesional. El que siempre me recibía con una sonrisa y palabras de aliento después de muchas horas de trabajo. No tengo palabras para agradecerte todo el amor y apoyo que siempre me has dado.

**Matteo** eres mi persona favorita, por quien me levanto todas las mañanas y por el que quiero superarme todos los días.

Los amo mucho...

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi esposo Valentin y a mi hijo Matteo, porque estuvieron conmigo siempre en los momentos de estrés y alegría durante este periodo.

A mis Padres: Natividad y Rodrigo por apoyarme, por cuidarme a Matteo cuando tenía que ir al laboratorio a trabajar.

A mis suegros: María Teresa y Valentín por su comprensión, paciencia y cuidados y sobre todo por querer y cuidar a Matteo.

A mis hermanos: Alan y Luis; a mis cuñados: Luis Martin y Adán, gracias por su apoyo.

A mis tíos y abuelos por apoyarme en los momentos más difíciles.

Estoy muy agradecida con mi asesor, el Dr. Omar Domínguez Domínguez. Gracias por la confianza, por su apoyo y por los consejos que contribuyeron a mi experiencia en este camino de la investigación.

Esta tesis no habría sido posible sin mi asesora, la Dra. Esperanza Meléndez Herrera. Quiero agradecerle por su tiempo, apoyo, dedicación, dirección y guía constante en el desarrollo de este trabajo. Siempre la he visto como un ejemplo a seguir. Muchas gracias por las pláticas y los consejos que ha compartido conmigo.

Quiero agradecer a mi comité tutorial, que sin ellos esta tesis no sería la que es sin sus recomendaciones: me gustaría reconocer a la Dra. Beatriz Yáñez Rivera por sus clases de estadística, por su ayuda, consejos y sugerencias en todo momento. Al Dr. Rodolfo Pérez Rodríguez y al Dr. Humberto Escalera Vázquez por su valiosa participación y sugerencias en las sesiones tutoriales.

Mi sincero agradecimiento a la Dra. Rebeca Rueda Jasso, por su guía y sus consejos.

Agradezco: a la Dra. Antonia Herrera por su apoyo y dedicación para terminar el procesamiento de muestras y análisis, incluso en vacaciones. Al M. en C. Ruben

Hernández por su apoyo y conocimiento en enseñarme a determinar los compuestos nitrogenados en muestras de agua. A la Dra. Arely Ramirez por el apoyo con las salidas a campo.

Agradezco a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, a la facultad de Biología, al Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con el número 743476 y a la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH.

Al Proyecto FishArk México, al zoológico de Chester en Inglaterra, al grupo de trabajo de goodeidos (Goodeid Working Group), al Fondo de Conservación de Especies Mohammed Bin Zayed.

También quiero agradecer a todos mis profesores y amigos.

A todos gracias.

# CONTENIDO

I. RESUMEN GENERAL.....	1
II. ABSTRACT .....	3
III. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
3.1.- La subfamilia Goodeinae .....	6
3.2.- La problemática ambiental del nitrógeno.....	7
3.3.- Contaminación por nitratos en los ecosistemas del Centro de México ...	8
3.4.- Efectos causados por la exposición al nitrato en peces.....	9
3.5.- Planteamiento del problema .....	12
IV. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS.....	14
V. OBJETIVOS .....	15
VI. RESULTADOS .....	16
CAPÍTULO I: Differential sensitivity of offspring from four species of goodeine freshwater fish to acute exposure to nitrates. ....	16
CAPÍTULO II: Realistic nitrate concentrations diminish reproductive indicators in <i>Skiffia lermae</i> , an endemic species in critical status.....	31
VII. DISCUSIÓN GENERAL .....	70
VIII. CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES.....	75
IX. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA .....	77
X. ANEXOS .....	85
El nitrógeno: tan esencial como tóxico .....	85
El impacto de los nitratos sobre la supervivencia de peces dulceacuícolas.	90

## I. RESUMEN GENERAL

Uno de los grupos más representativos del Centro de México es la subfamilia Goodeinae, cuyas especies se encuentran amenazadas debido a múltiples impactos de origen humano, incluyendo la contaminación de los cuerpos de agua por nitrógeno de nitrato (N-NO<sub>3</sub>). Los efectos de del N-NO<sub>3</sub> sobre las especies de la subfamilia Goodeinae son poco conocidos. El presente estudio evaluó: 1) el efecto de la exposición aguda al N-NO<sub>3</sub> durante 96 horas en crías de cuatro especies de goodeinos: *Skiffia lermae*, *Xenotoca variata*, *Goodea atripinnis* y *Allophorus robustus*; y 2) el efecto de la exposición crónica a concentraciones ecológicamente relevantes de N-NO<sub>3</sub> (5, 10 y 20 mg/L) durante 60 días en machos y hembras en etapa pre-reproductiva de la especie más sensible identificada en el primer experimento. El primer estudio incluyó el análisis de: a) la tasa de supervivencia; b) la concentración letal media (CL<sub>50</sub>); c) la distribución de los organismos en la columna de agua; d) las alteraciones histopatológicas en las branquias y el hígado de los organismos; y e) el índice de respuesta integrada de biomarcadores (IBR). En el segundo estudio se analizaron: a) la tasa de supervivencia; b) la conducta de alimentación; c) la distribución de los organismos en la columna de agua; d) la tasa de crecimiento; e) el recuento de células sanguíneas; y, f) las alteraciones histopatológicas en las branquias, el hígado y las gónadas de los organismos. De acuerdo con la tasa de supervivencia y la CL<sub>50</sub>, *S. lermae* y *X. variata* fueron las especies más sensibles y presentaron mayores alteraciones conductuales a concentraciones menores de N-NO<sub>3</sub> durante la exposición aguda. *Skiffia lermae* presentó las mayores alteraciones histopatológicas en las branquias, mientras *X. variata* y *A. robustus* presentaron las mayores alteraciones hepáticas. El IBR mostró que la especie más sensible fue *S. lermae* (IBR = 2.208) y la menos sensible fue *G. atripinnis* (IBR = 0.977). En el segundo estudio se observó una tasa de supervivencia del 36 % y un menor consumo de alimento en peces de *S. lermae* expuestos a concentraciones de 20 mg/L de N-NO<sub>3</sub>. La exposición a concentraciones de 5, 10 y 20 mg/L incrementó la frecuencia de organismos que se distribuyen en la superficie de la columna de agua (respiración superficial acuática). En el crecimiento y en el recuento de células sanguíneas no se observaron

diferencias significativas. Los machos y las hembras expuestos a 5, 10 y 20 mg/L de N-NO<sub>3</sub> presentaron menor proporción de epitelio respiratorio disponible para realizar el intercambio gaseoso y mayor daño hepático comparado con los organismos control. Las hembras presentaron una respuesta más marcada en branquias e hígado comparado con los machos, por lo que se analizaron sus ovarios. Las hembras expuestas a 10 y 20 mg/L de N-NO<sub>3</sub> presentaron menor densidad de ovocitos en etapa gonadal III, lo que sugiere una disminución en su fertilidad. Los resultados obtenidos muestran que concentraciones ecológicamente relevantes de N-NO<sub>3</sub> causan alteraciones fisiológicas en *S. lermae* que ponen en riesgo su supervivencia a largo plazo. Adicionalmente, los resultados obtenidos presentan evidencia que los límites permisibles para consumo humano y para descargas en cuerpos de agua se encuentran muy por encima de los límites fisiológicos de especies endémicas que habitan los cuerpos de agua.

Palabras clave: Subfamilia Goodeinae, CL<sub>50</sub>, histología gonadal, toxicidad aguda y toxicidad crónica.

## II. ABSTRACT

The Mexican Goodeids of the Goodeinae subfamily are one of the most representative groups of fishes from Central Mexico. However, these endemic species are threatened due to multiple impacts of human origin, including the contamination of water bodies by nitrate nitrogen ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ). Nevertheless, the toxicity of  $\text{N-NO}_3$  over species of the Goodeinae subfamily has not been documented. The present study evaluated: 1) the effect of acute exposure to  $\text{NO}_3\text{-N}$  for 96 hours in fry of four Goodeinae species: *Skiffia lermiae*, *Xeotoca variata*, *Goodea atripinnis*, and *Alloophorus robustus*; and 2) the effect of chronic exposure to ecologically relevant concentrations of  $\text{NO}_3\text{-N}$  (5, 10 and 20 mg/L) for 60 days in pre-reproductive males and females of the most sensitive species determined in the first evaluation. The first study included the analysis of: a) the survival rate; b) the median lethal concentration (LC50); c) the distribution of organisms in the water column; d) histopathological alterations in the gills and liver of the organisms and e) the integrated biomarker response rate (IBR). The second study analyzed: a) the survival rate, b) feeding behavior; c) the distribution of organisms in the water column; d) growth rate, e) blood cell count; and f) histopathologic changes in the gills, liver, and gonads of the organisms. The results of survival rate and LC50, indicate that *S. lermiae* and *X. variata* were the most sensitive species and exhibited greater behavioral disturbances at lower  $\text{NO}_3\text{-N}$  concentrations during acute exposure. *Skiffia lermiae* presented the greatest histopathological alterations in the gills, while *X. variata* and *A. robustus* presented the greatest liver alterations. The IBR showed that the most sensitive species was *S. lermiae* (IBR = 2.208) and the most tolerant was *G. atripinnis* (IBR = 0.977). For the second evaluation, a survival rate of 36 % was observed with concentrations of 20 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  and the organisms that are exposed to that same concentration have lower food consumption. Exposure to concentrations of 5, 10 and 20 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  causes a significant increase in the number of organisms distributed in the water column. In growth and in the blood cell count, no significant differences were observed between organisms at different  $\text{NO}_3\text{-N}$  exposure concentrations. Males and females exposed to 5, 10 and 20 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  presented a lower proportion of respiratory epithelium available for gas

exchange and greater liver damage compared to control organisms. Females presented a more marked response in gills and livers compared to males, so females' ovaries were analyzed. Females exposed to 10 and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L had lower gonadal stage III oocyte density, suggesting decreased fertility. The results obtained show that ecologically relevant concentrations of NO<sub>3</sub>-N cause physiological alterations in *S. lermae* that put their long-term survival at risk. Additionally, the results obtained present evidence that the permissible limits for human consumption and for discharges into bodies of water are well above the physiological limits of endemic species that inhabit the bodies of water.

Keywords: Subfamily Goodeinae, LC<sub>50</sub>, gonadal histopathology, acute toxicity, and chronic toxicity.

### III. INTRODUCCIÓN GENERAL

La subfamilia Goodeinae es considerada uno de los grupos más representativos de la Mesa Central de México y sus especies están restringidas a esta región. (Domínguez-Domínguez et al., 2008; Lyons et al., 2019). La severa explotación de los recursos naturales de la Mesa Central de México por la actividad agrícola, ganadera e industrial han provocado que la mayoría de los cuerpos de agua donde se distribuye la subfamilia Goodeinae estén contaminados (De la Vega-Salazar et al., 2003; De la Vega-Salazar y Macías-García, 2005; Domínguez-Domínguez et al., 2008; Ramírez-Herrejón et al., 2012).

La contaminación es una de las mayores amenazas para el mantenimiento de los ecosistemas de agua dulce. Es una de las causas que ha provocado que las especies de goodeinos hayan restringido sus áreas de distribución o incluso desaparecido durante los últimos 20 años, en tanto que algunas especies persisten en cuerpos de agua con altos niveles de contaminación (De la Vega-Salazar, 2005; Lyons et al., 2019). Según la NOM-059-SEMARNAT-2010, de las aproximadamente 41 especies de goodeinos, 18 están en peligro de extinción, cuatro amenazadas y una probablemente extinta. De acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2023) 13 especies están en peligro crítico, 14 en peligro, seis vulnerables, dos extintas en estado silvestre y una extinta. Lyons et al. (2019) reportan que ocho se encuentran en peligro crítico, 15 en peligro, nueve vulnerables, tres extintas en la naturaleza y dos extintas.

Entre los contaminantes persistentes en los ecosistemas de agua dulce se reporta al nitrógeno (Kumar-Pathak, 2013). El nitrógeno tiene un papel fundamental en el desarrollo y crecimiento de los organismos vegetales. Sin embargo, en exceso y la presencia de sus formas iónicas más comunes: el amonio, el nitrito y el nitrato, incrementan los problemas ambientales. Por ejemplo, el aumento de la concentración de iones hidrógeno, que da como resultado la acidificación de ríos y lagos; y la estimulación en el desarrollo, mantenimiento y proliferación de productores primarios, lo que da como resultado la eutrofización de los cuerpos de agua y proliferación de algas tóxicas. Además, sus formas iónicas producen

toxicidad que afecta la capacidad de los organismos acuáticos para sobrevivir, crecer y reproducirse (Camargo y Alonso, 2006).

Las investigaciones se han centrado en la toxicidad del amoníaco y el nitrito (Cano-Rocabayera et al., 2019). Debido a esto, hay poca información disponible con respecto a las concentraciones del ion nitrato, que es la forma más estable y abundante de nitrógeno (Camargo y Alonso, 2006; Gomez Isaza et al., 2020). La participación del nitrato en la supervivencia a largo plazo de las especies de peces ha sido desestimada, debido a que normalmente no alcanza concentraciones letales en ambientes naturales. Sin embargo, algunas investigaciones sugieren que las concentraciones que podemos encontrar en los ecosistemas de agua dulce pueden generar efectos tóxicos en los organismos (Edwards y Guillette, 2007).

A pesar de lo anterior, no se ha evaluado el potencial efecto tóxico del nitrato sobre las especies endémicas de la subfamilia Goodeinae. Esta evaluación es vital para comprender, proteger y elaborar modelos y/o predicciones de las especies endémicas de la subfamilia Goodeinae, al implementar estrategias de conservación que garanticen una buena calidad del agua y su supervivencia. Además, esta información es de utilidad para mantener en óptimas condiciones los cultivos de estos organismos bajo condiciones controladas.

### **3.1.- La subfamilia Goodeinae**

Los peces de la subfamilia Goodeinae son reconocidos debido a sus características biológicas particulares: 1) presentan fertilización interna, los machos tienen una modificación en la aleta anal en forma de lóbulo copulatorio (llamado espermatopodio) cuya función es la transferencia del paquete espermático al interior de la hembra; 2) presentan dimorfismo sexual en formas y coloraciones en algunas de las especies, así como un elaborado cortejo (Domínguez-Domínguez y Pérez Ponce de León, 2007); 3) presentan matrotrofia, para lo cual los embriones desarrollan una estructura especializada para obtener nutrientes y macromoléculas (lípidos y proteínas) y para el intercambio gaseoso con la madre. En los goodeinos este intercambio se lleva a cabo por medio de una estructura especializada conocida como trofotenia, la cual se forma una vez que el embrión es expulsado hacia el lumen del ovario, donde completa su desarrollo (Domínguez-Domínguez y

Pérez Ponce de León, 2007). La trofotenia se identifica como un tejido en la parte ventral de la cría, a la altura del ano, que puede adquirir diferentes formas y tiene las funciones análogas del cordón umbilical (Parenti, 1981).

La subfamilia se distribuye desde la cuenca de los ríos Mezquital y Salado en el norte, hasta el río Balsas por la vertiente del Pacífico y al río Pánuco por el Golfo de México, abarcando los estados de Durango, Zacatecas, Nayarit, San Luis Potosí, Jalisco, Colima, Guanajuato, Aguascalientes, Querétaro, Hidalgo, Tlaxcala, México, Morelos, Michoacán, Puebla, Guerrero y Estado de México (Domínguez-Domínguez y Pérez-Ponce de León, 2007; Domínguez-Domínguez et al., 2008).

Los ecosistemas de agua dulce de México están sujetos a un fuerte impacto por la actividad antropogénica. Algunos de los factores que contribuyen a su deterioro son: la contaminación de las aguas, la disminución de los mantos acuíferos, la deforestación de las cuencas, la desecación intencional de cuerpos de agua, la introducción de especies exóticas, sus parásitos, y la sobreexplotación pesquera (Domínguez-Domínguez et al., 2008; Ramírez-Herrejón et al., 2012).

### **3.2.- La problemática ambiental del nitrógeno**

La contaminación acuática es causada por la adición de cualquier sustancia líquida, gaseosa o sólida al agua que puede alterar su composición química, física y biológica, de tal forma que produzca daño a los organismos residentes (Tejerina-Garro et al., 2005; Bukola et al., 2015). Entre los contaminantes del agua se encuentra el nitrógeno inorgánico (Kumar-Pathak, 2013), el cual puede presentarse de manera natural como resultado de la deposición atmosférica, la escorrentía de las aguas superficiales y subterráneas, la descomposición de depósitos geológicos ricos en nitrógeno, la fijación del nitrógeno por cianobacterias y la degradación biológica de la materia orgánica (Camargo et al., 2005; Camargo y Alonso, 2006; Baker et al., 2017). Además de las fuentes naturales, el nitrógeno inorgánico puede entrar a los ecosistemas de agua dulce a través de fuentes puntuales, como son los residuos y vertidos de granjas de animales, piscifactorías continentales, centros de acuicultura marina, vertidos industriales y municipales sin un tratamiento adecuado y procesos de escorrentía e infiltración en basureros (Camargo y Alonso, 2007). Al mismo tiempo, el nitrógeno puede provenir de fuentes no puntuales, que involucran

procesos de escorrentía e infiltración en campos de cultivo, procesos de escorrentía e infiltración en praderas y bosques quemados, emisiones a la atmósfera provenientes del uso de combustibles fósiles y fertilizantes y la posterior deposición atmosférica sobre las aguas superficiales (Kellock et al., 2018). El nitrógeno puede aparecer en forma de amoníaco o ion amonio, en forma de nitritos y finalmente en nitratos, que es la forma más usual y estable (Baker et al., 2017). Los nitratos se consideran menos tóxicos que el amonio y los nitritos, debido a su estado de oxidación y a su baja permeabilidad branquial. Sin embargo, la concentración de nitrato es generalmente más alta que la del amoníaco y el nitrito, debido al proceso de oxidación del amoníaco a nitrito y de nitrito a nitrato como producto final de la nitrificación, y las concentraciones excesivas de nitrato conducen a toxicidad e incluso a la muerte de los organismos acuáticos (Kim et al., 2019). La toxicidad de un compuesto describe el grado en el cual una sustancia produce efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con ella (por absorción o ingestión).

### **3.3.- Contaminación por nitratos en los ecosistemas del Centro de México**

La contaminación afecta aproximadamente al 80 % de las cuencas hidrológicas de México en diversos grados; los casos más extremos son el Pánuco, Lerma-Santiago, los ríos San Juan y Balsas, que reciben el 50 % del total de vertidos de aguas residuales del país (Lyons et al., 2020). Sin embargo, el río Lerma es uno de los más importantes para la diversidad íctica del país, alberga el mayor número de especies de goodeinos y tiene una de las mayores tasas de endemismo de peces, que alcanza el 66 % (Domínguez-Domínguez y Pérez Ponce de León, 2007).

Estudios de calidad del agua realizados en el cauce del río Lerma en abril del 2015, registraron concentraciones de nitrógeno de nitrato (N-NO<sub>3</sub>) desde 2 hasta 9 mg/L en el curso medio y bajo del río Lerma. Mientras que, en el curso alto del río Lerma se registraron concentraciones desde 3 a 30 mg/L de N-NO<sub>3</sub> (Pérez-Díaz et al., 2019). Las aguas residuales transportadas por el río Lerma desembocan en el Lago de Chapala. De acuerdo con Trujillo-Cárdenas et al. (2010) se registraron concentraciones desde 1.51 a 4.58 mg/L de N-NO<sub>3</sub> en muestras de agua que se

recolectaron durante la estación seca (marzo y abril) del 2006, en 9 sitios diferentes ubicados a lo largo del lago de Chapala.

En diferentes estudios se ha comprobado que la concentración de N-NO<sub>3</sub> es variable entre diferentes cuerpos de agua y a lo largo del año: en el lago de Yuriria se registraron concentraciones desde 1.7 a 3.9 mg/L de N-NO<sub>3</sub> en muestras de agua que se recolectaron en febrero y mayo del 2010 en 15 sitios dentro del lago (Espinal-Carreón et al., 2013). En el lago de Cuitzeo se registraron concentraciones desde 0.1 a 1.6 mg/L de N-NO<sub>3</sub> en muestras de agua que se recolectaron en 12 sitios dentro del lago, en el mes de noviembre del 2006 (Alfaro, 2010). En el lago de Zacapu se registraron concentraciones desde 0.055 a 1.0 mg/L de N-NO<sub>3</sub> en muestras de agua que se recolectaron en cinco sitios dentro del lago, en los meses de junio del 2016 a febrero del 2017 (Quezadas-Vivian, 2018). Por último, en el manantial La Mintzita se registraron concentraciones desde 0.04 a 0.38 mg/L de N-NO<sub>3</sub> en muestras de agua que se recolectaron en cuatro sitios dentro del manantial, en las cuatro temporadas del año 2002 (Ortega-Murillo et al., 2007).

### **3.4.- Efectos causados por la exposición al nitrato en peces**

El incremento de los nitratos en los ecosistemas de agua dulce es de importancia actual debido a los efectos negativos sobre los organismos y la degradación del recurso agua como resultado de las actividades humanas (Simonyan et al., 2016; Pottinger, 2017; Gomez Isaza et al., 2020). Comprender los impactos de los contaminantes ambientales para poder proteger a las poblaciones biológicas, comunidades y a los ecosistemas es el fundamento de la ecotoxicología (Bláha y Hofman, 2020). La toxicología ambiental investiga los efectos de los contaminantes en organismos individuales, órganos, tejidos, tipos de células y reacciones bioquímicas (Tolleson, 2018).

La ecotoxicología y la toxicología ambiental se basan en pruebas de toxicidad. La prueba aguda es aquella en la cual los organismos están expuestos a un tóxico durante un periodo de tiempo corto (horas o días, normalmente 96 horas). Esta prueba también es conocida como concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) y se ha utilizado para generar la información base que ha permitido establecer normativas de calidad del agua. La CL<sub>50</sub> determina la concentración de un contaminante que provoca el 50

% de la mortalidad de los organismos de prueba. En las pruebas crónicas los organismos están expuestos a un tóxico durante periodos largos de tiempo, generalmente una décima parte o más del ciclo de vida de los organismos. Las pruebas en las que se utilizan concentraciones de un tóxico menores de las que provocan mortalidad se conocen como pruebas subletales. Las pruebas subletales y crónicas reflejan mejor lo que ocurre en los ecosistemas de agua dulce, debido a que se utilizan concentraciones cercanas a las encontradas en el ambiente y evalúan los efectos tóxicos sobre la salud, el crecimiento y la reproducción de los organismos (Sprague, 1990).

Las pruebas de toxicidad emplean biomarcadores como herramientas para evaluar los efectos de los contaminantes en los organismos y para establecer estrategias de conservación para las especies más afectadas (Tejeda-Vera et al., 2007; Kroon et al., 2017; Bláha y Hofman, 2020). Los biomarcadores se obtienen de mediciones en fluidos corporales, células o tejidos que indican modificaciones o alteraciones morfológicas, moleculares, bioquímicas, fisiológicas y de comportamiento (Van der Oost et al., 2003). El empleo de estos biomarcadores puede proporcionar una respuesta rápida para evaluar fases tempranas de efectos de los nitratos sobre peces y de esta manera pueden ser exitosamente integrados en programas de conservación y manejo de especies ícticas.

#### 3.4.1.- Absorción del nitrato en los peces

La principal ruta de absorción del nitrato en el cuerpo de los peces son las branquias. La absorción por este órgano se considera pasiva, debido a la baja permeabilidad. La teoría de la absorción pasiva y la baja permeabilidad branquial se han utilizado como explicación de la baja afinidad del nitrato para causar toxicidad en comparación con otros compuestos nitrogenados (Davidson et al., 2014).

El tracto gastrointestinal se considera una ruta alternativa; una vez que el nitrato es ingerido, las bacterias del tracto oral y digestivo reducen el nitrato a nitrito (Monsees et al., 2017).

Los efectos causados por la exposición al nitrato en peces son dependientes principalmente de la concentración de exposición y de la sensibilidad de la especie.

La mayoría de los efectos siguientes se han observado en peces cuando se exponen a concentraciones elevadas de nitrato.

#### 3.4.2.- Efectos anatómicos

Se han identificado cambios en la estructura de las branquias: hiperplasia de las células epiteliales, edema, hiperemia, hemorragias y necrosis de células epiteliales (Pereira et al., 2017; Torno et al., 2018).

El tracto gastrointestinal, al estar en contacto con altas concentraciones de nitrato, presenta atrofia de las vellosidades intestinales y por consiguiente una absorción deficiente de nutrientes. Estas alteraciones explican algunos de los comportamientos de los organismos como la emaciación y el letargo (Pereira et al., 2017).

Los niveles elevados de nitrato pueden afectar el hígado, que es el sitio primario para los procesos de desintoxicación (Kellock et al., 2018). Los estudios histopatológicos muestran cambios en la vacuolización de hepatocitos, hipertrofia y necrosis (Pereira et al., 2017).

Los riñones presentan una serie de cambios histopatológicos inducidos por las elevadas concentraciones de nitrato: degeneración de los glomérulos, aumento del espacio de Bowman, de la luz tubular, edema, hiperemia, hemorragia, mineralización de túbulos y nefrocalcinosis o fibrosis renal intersticial (Pereira et al., 2017; Torno et al., 2018).

#### 3.4.3.- Efectos fisiológicos

El principal mecanismo de toxicidad de los nitratos es la alteración en la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre, debido a que el ion ferroso de la hemoglobina es oxidado por el nitrato y lo convierte en ión férrico, lo que transforma a la hemoglobina en formas incapaces de transportar oxígeno (p.ej., metahemoglobina. Yang et al., 2019). Este fenómeno conduce a una disminución en la tasa de consumo de oxígeno (Tilak et al., 2007) y provoca alteraciones conductuales como: letargo, disminución de la velocidad de natación y frecuentes períodos de descanso (Monsees et al., 2017). Además, se puede presentar una disminución en el tamaño de los organismos, en tanto la energía necesaria para el crecimiento se desvía y se invierte preferentemente hacia la desintoxicación y la conversión de

metahemoglobina a hemoglobina por la enzima NADH-metahemoglobina reductasa dependiente de energía (Gomez Isaza et al., 2020). También, el nitrato puede interferir con el equilibrio iónico e inducir un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y enzimas antioxidantes, capaz de producir daño a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las enzimas antioxidantes SOD y CAT proporcionan la primera línea de defensa celular para las ROS (Kim et al., 2019).

#### 3.4.4.- Efectos endocrinos

El nitrato es considerado un disruptor endocrino (Cano-Rocabayera et al., 2019). Las hormonas tiroideas son las únicas hormonas que contienen yodo en los vertebrados. Se sabe que el nitrato actúa como un inhibidor competitivo de la acumulación de yoduro en la tiroides al unirse al cotransportador de yoduro de sodio y evitar la respuesta biológica normal. De esta forma, se produce una reducción en las hormonas tiroideas y por consiguiente una disminución en las tasas de crecimiento de los organismos (Baker et al., 2017; Monsees et al., 2017).

Además, el nitrato causa o se asocia con una reducción en los niveles de hormonas esteroideas, tasas de fertilización y calidad del semen, lo que sugiere un efecto negativo sobre la función reproductiva (Edwards y Guillette, 2007; Edwards y Hamlin, 2018). Edwards y Guillette (2007) observaron que un aumento del nitrógeno de nitrato de hasta 5 mg/L, se asocia negativamente con el total de recuentos de espermatozoides en *Gambusia holbrooki*.

La inducción de la síntesis de vitelogenina masculina es una respuesta provocada por una señal en la hormona estradiol, que puede ser debida a la exposición de los organismos a productos químicos con actividades estrogénicas (Bjerregaard et al., 2018).

#### **3.5.- Planteamiento del problema**

Los nitratos se encuentran de manera natural en los ecosistemas de agua dulce, su concentración en aguas superficiales normalmente es baja (<0.015 mg/L; Allan y Castillo, 2007). No obstante, debido a las actividades humanas, pueden llegar a alcanzar concentraciones elevadas, de hasta 100 mg/L, lo que los convierte en sustancias tóxicas (Camargo y Alonso, 2006). El potencial efecto tóxico del nitrato

sobre las especies endémicas de peces que habitan el Centro de México no ha sido evaluado. La subfamilia Goodeinae está restringida a las cuencas hidrológicas del Centro de México, las cuales presentan diferentes niveles de perturbación debido al aporte de residuos municipales, industriales y de actividades agropecuarias (Domínguez-Domínguez et al., 2008; Ramírez-Herrejón et al., 2012). En este contexto, se planteó la siguiente pregunta general de investigación: ¿Cuáles son los efectos de la exposición al nitrato en la supervivencia, la conducta, el crecimiento, los parámetros sanguíneos y los marcadores histológicos de especies selectas de la subfamilia Goodeinae? La escasa información publicada al respecto y la inexistencia de estudios que establezcan el límite permisible de nitrato para la supervivencia, crecimiento y reproducción de las especies de goodeinos, hace necesario profundizar en este campo, con la finalidad de lograr evidencia científica para establecer límites de las concentraciones de nitratos seguras y de riesgo en especies de la subfamilia Goodeinae.

## IV. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS

### HIPÓTESIS GENERAL

- La exposición a niveles tóxicos de nitrato tiene efectos negativos en la supervivencia, la conducta, el crecimiento, los parámetros sanguíneos y los marcadores histológicos de especies selectas de la subfamilia Goodeinae.

### HIPÓTESIS PARTICULARES

#### Capítulo 1.

- La exposición aguda a concentraciones letales de nitrato provoca una menor supervivencia y mayores alteraciones conductuales e histológicas en las especies de goodeinos más susceptibles a las perturbaciones.

#### Capítulo 2.

- La exposición crónica a concentraciones subletales de nitrato disminuye la supervivencia, el crecimiento, el consumo de alimento, la proporción de epitelio respiratorio disponible para el intercambio gaseoso y los indicadores reproductivos, además, provoca un incremento en el número de eritrocitos inmaduros en sangre y en el índice de daño hepático en la especie *Skiffia lermæ*.

## V. OBJETIVOS

### GENERAL

- Evaluar los efectos de la exposición al nitrato en la supervivencia, la conducta, el crecimiento, los parámetros sanguíneos y los marcadores histológicos de especies selectas de la subfamilia Goodeinae

### PARTICULARES

- Evaluar la sensibilidad diferencial en *Skiffia lermae*, *Xenotoca variata*, *Goodea atripinnis* y *Alloophorus robustus* a la exposición aguda a concentraciones letales de nitrato.
- Evaluar el efecto de la exposición crónica a concentraciones subletales de nitrato en la supervivencia, la conducta, el crecimiento, los parámetros sanguíneos y los marcadores histológicos de machos y hembras de *Skiffia lermae*, la especie más sensible identificada en el primer objetivo.

Cada uno de los objetivos particulares fue abordado en un capítulo independiente con la estructura de artículo. El primero sobre la sensibilidad diferencial ya publicado y el segundo en revisión. Además, como parte documental del desarrollo de la tesis se elaboraron dos artículos de divulgación ya publicados que se presentan como Anexos.

## **VI. RESULTADOS**

### **CAPÍTULO I: Differential sensitivity of offspring from four species of goodeine freshwater fish to acute exposure to nitrates.**

Publicado en: *Frontiers in Ecology and Evolution* 10:1014814

DOI:10.3389/fevo.2022.1014814



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Georgina Alexandra Rivera-Ingraham,  
Universidad Católica del Norte, Chile

## REVIEWED BY

Wenyi Zhang,  
Nanjing Normal University, China  
Ahasan Habib,  
University of Malaysia Terengganu,  
Malaysia

## \*CORRESPONDENCE

Esperanza Meléndez-Herrera  
emelendez@umich.mx

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Ecophysiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Ecology and Evolution

RECEIVED 09 August 2022

ACCEPTED 12 September 2022

PUBLISHED 29 September 2022

## CITATION

Villa-Villaseñor IM, Yáñez-Rivera B,  
Rueda-Jasso RA, Herrera-Vargas MA,  
Hernández-Morales R,  
Meléndez-Herrera E and  
Dominguez-Dominguez O (2022)  
Differential sensitivity of offspring from  
four species of goodeine freshwater  
fish to acute exposure to nitrates.  
*Front. Ecol. Evol.* 10:1014814.  
doi: 10.3389/fevo.2022.1014814

## COPYRIGHT

© 2022 Villa-Villaseñor, Yáñez-Rivera,  
Rueda-Jasso, Herrera-Vargas,  
Hernández-Morales,  
Meléndez-Herrera and  
Dominguez-Dominguez. This is an  
open-access article distributed under  
the terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the  
original author(s) and the copyright  
owner(s) are credited and that the  
original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice. No use, distribution  
or reproduction is permitted which  
does not comply with these terms.

# Differential sensitivity of offspring from four species of goodeine freshwater fish to acute exposure to nitrates

Ivette Marai Villa-Villaseñor<sup>1</sup>, Beatriz Yáñez-Rivera<sup>2</sup>,  
Rebeca Aneli Rueda-Jasso<sup>3</sup>, Ma. Antonia Herrera-Vargas<sup>4</sup>,  
Rubén Hernández-Morales<sup>3</sup>, Esperanza Meléndez-Herrera<sup>4\*</sup>  
and Omar Domínguez-Domínguez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico, <sup>2</sup>CONACYT-CIAD, AC Mazatlán Unit for Aquaculture and Environmental Management, Mazatlan, Mexico, <sup>3</sup>Laboratorio de Biología Acuática, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico, <sup>4</sup>Laboratorio de Ecofisiología Animal, Instituto de Investigaciones Sobre Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico

Nitrate-nitrogen (NO<sub>3</sub>-N) pollution related to anthropogenic activities is increasing in freshwater ecosystems. Knowledge about NO<sub>3</sub>-N sensitivity in freshwater wild fish is needed to understand the differential tolerance between species. Goodeinae is a subfamily of 41 endemic fishes that inhabit central Mexico, with 33 species in the IUCN red list and three extinct. Distributional patterns suggest tolerant and sensitive goodeines related to the conservation gradient of freshwater ecosystems. Four species with a differential distribution and tolerance were selected to evaluate their physiological responses to NO<sub>3</sub>-N. Fish were exposed to different NO<sub>3</sub>-N concentrations for 96 h and the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) was determined. Swimming disorders plus gill and liver histopathological indexes were estimated and incorporated into an Integrated Biomarker Response (IBR) for each species. *Skiffia lermæ* (LC<sub>50</sub> = 474.332 mg/L) and *Xenotoca variata* (LC<sub>50</sub> = 520.273 mg/L) were more sensitive than *Goodea atripinnis* (LC<sub>50</sub> = 953.049 mg/L) and *Alloophorus robustus* (LC<sub>50</sub> = 1537.13 mg/L). The typical histological damage produced by NaNO<sub>3</sub>-N exposure was fusion of secondary lamellae in gills. This was present in all species and cellular degeneration was observed at the highest concentrations. Secondary lamellae aneurysms were only observed in *G. atripinnis*. Liver alterations included vascular dilation in hepatic sinusoids, hyperemia and nuclear hypertrophy; higher concentrations produced hepatocyte cytoplasmic vacuolation and reduced frequency of cell nuclei. Behavioral and histopathological alterations could explain the differential species sensitivity. The results suggest that

species which preserve gill function and transfer the task of detoxification to the liver might have the best chance of surviving in polluted environments. Moreover, species previously considered as tolerant may be highly susceptible to  $\text{NaNO}_3\text{-N}$  exposure. Therefore, it is necessary to closely monitor  $\text{NaNO}_3\text{-N}$  concentrations in freshwater ecosystems and, if possible, reduce their levels to avoid the loss of wild populations.

#### KEYWORDS

ecotoxicology, LC50 96 h, histopathological changes, swimming behavior, gill, liver

## Introduction

One of the most representative fish groups in central Mexico are the goodeines. The major diversification within this group occurs in the Río Lerma-Santiago basin, one of the most polluted basins in the world (Domínguez-Domínguez et al., 2006, 2008; Lyons et al., 2019). The Goodeinae subfamily is composed of 41 species from 19 genera (Domínguez-Domínguez et al., 2008; Lyons et al., 2019). This group presents unique reproductive characteristics such as internal fertilization, matrotrophy, and viviparity (Iida et al., 2019), and is considered one of the most at-risk groups in the world (Duncan and Lockwood, 2001). During the last decades, their populations have decreased related to pollution and other anthropogenic activities (Lyons et al., 2019). According to the IUCN (2022), 13 species are critically endangered, 14 endangered, six vulnerable, two extinct in the wild, and one extinct. Most Goodeinae species are endemic or micro-endemic to a single spring, portion of a river or drainage, whereas others are widely distributed in the region (Foster and Piller, 2018). These distributional patterns suggest tolerant and sensitive goodeines related to the conservation gradient of freshwater ecosystems (Rueda-Jasso et al., 2017; Lyons et al., 2019). For example: *Skiffia lermae* and *Allophorus robustus* have been classified as endangered, sensitive, and vulnerable species, respectively; since they only are found in spring areas, lake shorelines and small tributaries (Miller et al., 2009; Lyons et al., 2019). *Xenotoca variata* and *Goodea atripinnis* are considered as least concern and tolerant species, because some areas they inhabit are classified as highly polluted aquatic environments (Domínguez-Domínguez et al., 2008; Rueda-Jasso et al., 2017; Lyons et al., 2019).

Nitrates ( $\text{NO}_3$ ) constitute the most stable and abundant form of dissolved inorganic nitrogen in aquatic ecosystems (Galloway et al., 2004). Although nitrate-nitrogen ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) may be naturally present, they accumulate in the ecosystem due to human activities such as livestock and agricultural use of inorganic nitrogenous fertilizers. Municipal and industrial wastewater effluents also increase nitrogenous compounds (Du et al., 2019; Goeller et al., 2019). Despite the abundance of

$\text{NO}_3\text{-N}$ , their impact on fish welfare has been underestimated since they are less toxic than other nitrogenous compounds (van Bussel et al., 2012; Kim et al., 2019; Presa et al., 2022). However,  $\text{NO}_3\text{-N}$  negatively impact fish health (Camargo et al., 2005; Guillette and Edwards, 2005; McGurk et al., 2006; Gomez-Isaza et al., 2018, 2020, 2021; Presa et al., 2022).

The standard sensitivity evaluation to acute toxicity is the median lethal concentration ( $\text{LC}_{50}$ ). This index is usually complemented with other responses to increase the understanding of physiological trade-offs under acute exposure or predict the long-term permanence of fish in polluted environments (Kim et al., 2019; Dutra et al., 2020). Exposure bioassays to  $\text{NO}_3\text{-N}$  in fish revealed more sensitivity during early life stages (Rueda-Jasso et al., 2017), likely due to interference with biological processes such as body growth and reproductive development or behavior (Yu et al., 2021). The gills are the main route of  $\text{NO}_3\text{-N}$  absorption (Pereira et al., 2017). Physiological responses to pollutants aim to maintain gill activity preceding the loss of function related to the degree of damage (Emam et al., 2022). Inside the body,  $\text{NO}_3\text{-N}$  causes physiological and behavioral alterations (Torno et al., 2018; Yang et al., 2019; Yu et al., 2021). The liver is the detoxifying organ and its condition indicates environmental quality (Corredor-Santamaría et al., 2021; Tramunt et al., 2021; Santos et al., 2022). Toxic pollutants cause functional alterations of the gills and liver, such as gas exchange failure and metabolic damage. These changes are associated with altered swimming behavior, such as loss of balance, top or bottom position in the water column and lethargy (Rodrigues et al., 2011; Schram et al., 2012; Pereira et al., 2017; Yang et al., 2019).

Given the conservation relevance of goodeines and based on the premise that differential persistence in freshwater bodies could be related to differential sensibility to environmental pollutants, the main objective of this study was to evaluate  $\text{NO}_3\text{-N}$  sensitivity in offspring of *S. lermae*, *X. variata*, *G. atripinnis*, and *A. robustus*. Differential sensitivity was evaluated by  $\text{LC}_{50}$  values, histopathological indexes from the gills and liver, as well as swimming behavior alterations under acute exposure (96 h).

Integrated Biomarker Response (IBR) analysis was performed to contrast their sensitivity.

## Materials and methods

### Ethical statements

Sampling and laboratory fish handling protocols were reviewed and approved (SEMARNATSGPA/DGVS/00012/19, PPF/DGOPA-014/20). The protocols also followed the [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals \(1996\)](#). Toxicity was evaluated with the Fish Acute Toxicity Test ([OECD, 2019](#)).

### Field collection and fish maintenance

Gravid females of *S. lermae* ( $n = 25$ ), *X. variata* ( $n = 20$ ), *G. atripinnis* ( $n = 7$ ), and *A. robustus* ( $n = 5$ ) were collected from Zacapu Lake, central Mexico ( $19^{\circ}49'26.88''N$ ;  $101^{\circ}46'37.32''W$ ), during years 2020 and 2021, using 2 mm aluminum mesh minnow traps (Gee-minnow-traps® G-40, USA). Gravid females were transported to the laboratory with water from the collection site. Females were acclimatized for 15 days in 120 L aquariums (loading capacity: 6 L per fish), with dechlorinated water and 7 mg/L of dissolved oxygen, at  $22^{\circ}C$ , under a natural light photoperiod. They were fed two times each day with *Artemia* sp. and commercial Wardley fish flakes ([Rueda-Jasso et al., 2017](#)). On post-natal days 1–7, offspring were separated from their mothers, fed and housed under the same conditions previously described. Offspring remain in these conditions until post-natal 21, when they were subjected to the experiment (see below).

### Water quality monitoring and solutions

Temperature, dissolved oxygen, pH, salinity, total dissolved solids and electric conductivity were recorded every 24 h using a multiparameter probe (YSI EXO2, Ohio, USA). The toxicity assay solution was prepared with sodium nitrate ( $NaNO_3$ , 97%, Sigma-Aldrich) according to a stoichiometric calculation ([Dutra et al., 2020](#)). Concentrations of ammonium-nitrogen ( $NH_4-N$ ), nitrite-nitrogen ( $NO_2-N$ ), and  $NO_3-N$  were measured following the methodologies described in the American Public Health Association ([American Public Health Association \[APHA\], 2017](#)).

### Toxicity test

Each fry was acclimatized for 7 days, weighted with an analytical precision balance (OHAUS™ Adventurer  $d = 0.0001$  g, China), their length was measured using a digital

Vernier caliper (Thermo Fisher Scientific™ S/N 1366162, USA) and then randomly assigned to a treatment. Three replicates were used per treatment, with 10 fish in 10 L tanks (loading capacity: 1 L per fish). A control group was included for each species.

During  $NO_3-N$  exposure, survival was monitored at 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72, and 96 h. Mortality was confirmed by the absence of response to stimulation. Swimming behavior (loss of balance and position in the bottom, middle, or surface of the water column) was recorded during 10 min by counting the animals that exhibited these actions at the same intervals mentioned above. Changes in swimming behavior were categorized as “low effect,” indicating an alteration in 10–33% of individuals; “moderate effect” 34–63% and “high effect,” 64–100%. Changes to swimming patterns were recorded only if they occurred in 10% of the fish within each aquarium ([Ogueji et al., 2018](#)). At the end of the experiment, surviving fish were anesthetized using clove oil ( $50 \mu l L^{-1}$ ) and processed for histology. Fish in the highest  $NO_3-N$  concentrations were removed from the aquariums immediately after they became immobile.

### Histological evaluation

Three individuals from three treatments (control, that closest to the  $LC_{50}$  and the most lethal concentration,  $LC_{100}$ ) per species were randomly selected and processed by routine histology. Gill and liver  $5 \mu m$  transversal sections were obtained and stained with hematoxylin-eosin ([Bancroft and Cook, 1994](#); [Cano-Rocabayera et al., 2019](#)). Slides were observed with a Leica microscope (DM3000, Germany), photo-documented using a camera (Leica DFC310 FX, Germany) and analyzed using NIH ImageJ software.

### Gill and liver histopathological indexes

The histopathological condition index (HI) was calculated for each organism ([Bernet et al., 1999](#); [Antunes et al., 2017](#)). Briefly, according to distinctive histological features, gill and liver alterations were classified into circulatory, progressive and regressive patterns. A pathological importance factor ( $w$ ) was assigned for each type of damage ([Supplementary Table 1](#)). Similarly, a score value ( $a$ ) was assigned for the occurrence of alterations from 0 to 5 (where 0 is no change; 1, changes in 1–20% of the sections; 2, 21–40%; 3, 41–60%; 4, 61–80%; 5, 81–100%, respectively). The HI for each rp was determined using the formula:  $HI_{rp \text{ org}} = \sum_{alt} (w \times a)$  where  $HI_{rp \text{ org}}$  is the reaction index of the organ for each reaction pattern (rp) and alt is the alteration ([Antunes et al., 2017](#)).

### Liver damage tissue index

For the liver, tissue damage was assessed by nuclear density ( $nD = \text{number of nuclei/mm}^2$ ) and nuclear area ( $nA = \text{area}$

of hepatocyte nuclei in  $\mu\text{m}^2$ ; [Rodrigues et al., 2017](#)). The average value of controls ( $nD_c$  and  $nA_c$ ) was used as a reference to calculate a relative value for each feature. Since an increase in the nuclear area could indicate hypertrophy and a reduction could be related to pyknotic nuclei, the absolute value of the difference to 1 multiplied by 0.5 was used. Finally, the values were integrated into the following index:  $\text{LDTI} = (nD^*/nD_c) + [|1 - (nA^*/nA_c)| \times 0.5]$ , where values near 1 indicate a normal or reference condition and values closest to 0 indicate major tissue damage.

## Statistical analysis and integrated biomarkers response

All analyses were performed with R software ([R Core Team, 2022](#), version 4.1.3). Variables were tested for normality and homoscedasticity with Shapiro-Wilk and Levene's tests, respectively. The survival rate for each species was calculated by the Kaplan Meier method and compared with the log-rank test using the "survival" and "survminer" packages. Acute toxicity to  $\text{NaNO}_3\text{-N}$  was determined by the  $\text{LC}_{50}$  for each species (95% confidence intervals after 96 h) using the Spearman-Kärber method and considered significantly different when not overlapping using the "tsk" package. Relationships between swimming disorders and concentrations at each exposure time were analyzed with Spearman correlations using the "stats" package; graphs were produced using the "ggpubr" package. Histomorphometric analyses were performed using the "car" and "pgirmess" packages. LDTI data distribution was analyzed by a Kruskal-Wallis test. Tukey multiple range *post-hoc* tests were used to discriminate means ([Torno et al., 2018](#)). The values obtained for each parameter were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Survival rates,  $\text{LC}_{50}$ , swimming behavior, GHI, LHI, and LDTI were incorporated into an IBR to visualize and compare species-specific responses to acute  $\text{NaNO}_3\text{-N}$  exposure using the "IBRtools" package ([Bertrand et al., 2016](#)).

## Results

### $\text{NaNO}_3\text{-N}$ exposure and water quality

Concentrations for acute toxicity assays were determined for each species. Thus, each species was exposed to slightly different ranges; *S. lermae*: 100, 200, 400, 800, and 1,200 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ ; *X. variata*: 200, 400, 800, 1,200, and 1,600 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ ; *G. atripinnis*: 400, 800, 1,200, 1,600, 2,000, and 2,400 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ ; and *A. robustus*: 400, 800, 1,200, 1,600, 2,000, 2,400, and 2,800 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ . The body mass, length and total number of offspring for each species was:  $0.028 \pm 0.0004$  g;  $12.265 \pm 0.058$  mm;  $n = 180$  for *S. lermae*,  $0.072 \pm 0.001$  g;  $15.656 \pm 0.103$  m;  $n = 180$  for *X. variata*,

$0.184 \pm 0.001$  g;  $20.122 \pm 0.047$  mm;  $n = 210$  for *G. atripinnis* and  $0.182 \pm 0.001$  g;  $21.382 \pm 0.055$  mm;  $n = 240$  for *A. robustus*.

Water quality conditions (temperature:  $22.059 \pm 0.003^\circ\text{C}$ ; dissolved oxygen:  $7.069 \pm 0.001$  mg/L; pH:  $8.930 \pm 0.004$  log units; ammonium:  $0.003 \pm 4.88104\text{E-}06$  mg/L and nitrite:  $0.042 \pm 0.002$  mg/L) in the experimental tanks were similar for all groups and maintained in a range similar to the natural variations observed in Zacapu lake ([Ramírez-García et al., 2022](#)). Salinity ( $0.281 \pm 0.001\text{--}12.041 \pm 0.096$  g/L), total dissolved solids ( $379.033 \pm 1.913\text{--}13,017.266 \pm 84.070$  mg/L) and electric conductivity ( $551.290 \pm 2.691\text{--}19,103.63 \pm 141.191$   $\mu\text{S/cm}$ ) increased as  $\text{NaNO}_3\text{-N}$  concentrations increased.

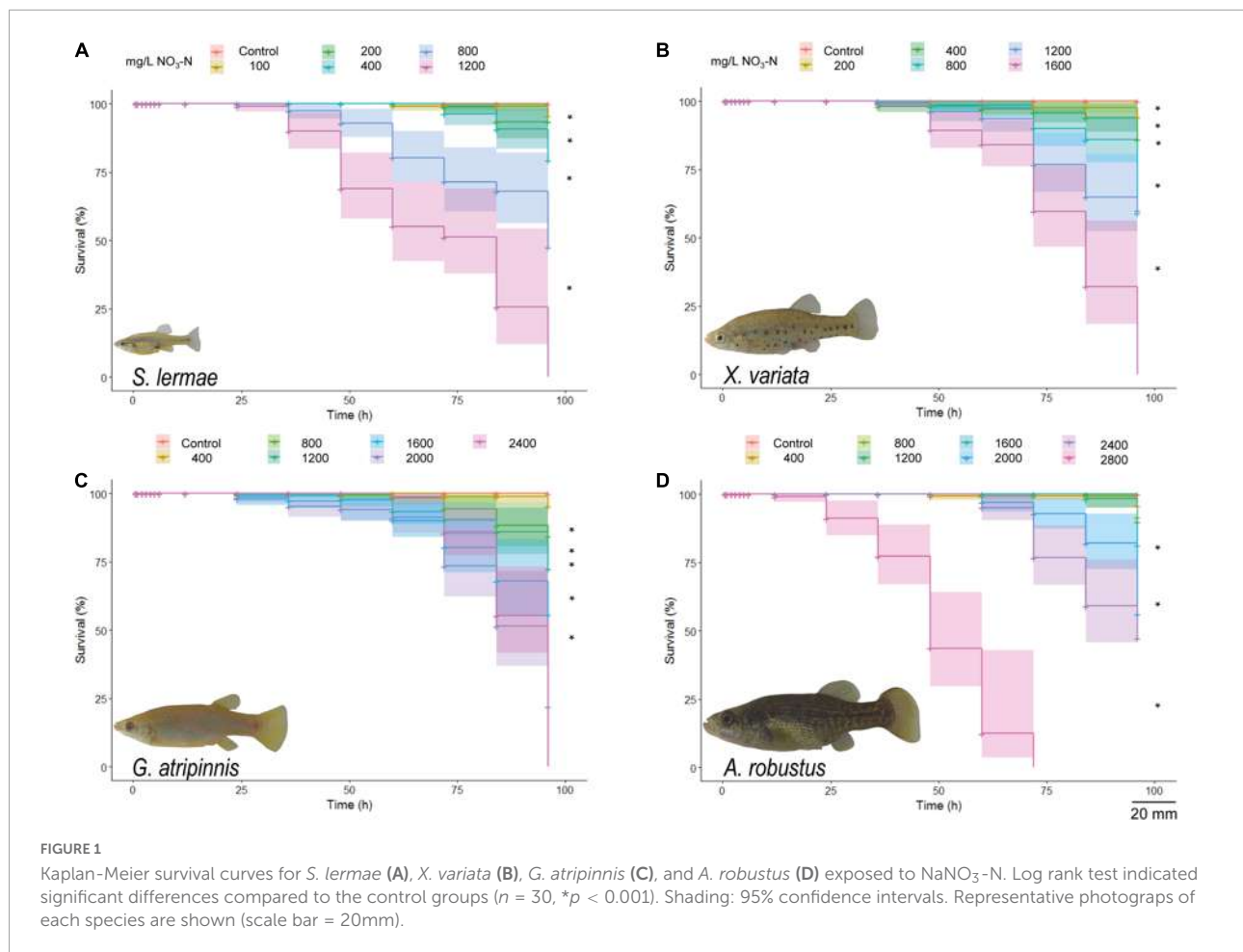
### Survival rate and lethal concentration 50%

Survival rates for the four Goodeinae species decreased as  $\text{NaNO}_3\text{-N}$  concentrations increased and were related to exposure time. No mortality was observed at control concentrations ([Figure 1](#)). Survival rates for *S. lermae* and *X. variata* showed significant differences above 200 mg  $\text{NaNO}_3\text{-N/L}$  vs. control [*S. lermae*:  $X^2_{(5)} = 306$ ;  $p \leq 0.001$ ; *X. variata*:  $X^2_{(5)} = 149$ ;  $p \leq 0.001$ ]; no fish survived after 96 h at 1,200 mg  $\text{NaNO}_3\text{-N/L}$  for *S. lermae* and at 1,600 mg  $\text{NaNO}_3\text{-N/L}$  for *X. variata* ([Figures 1A,B](#)). Survival rates for *G. atripinnis* showed significant differences above 800 mg  $\text{NaNO}_3\text{-N/L}$  vs. control [ $X^2_{(6)} = 131$ ;  $p \leq 0.001$ ] and no fish survived at 2,400 mg  $\text{NaNO}_3\text{-N/L}$  ([Figure 1C](#)). For *A. robustus* significant differences were observed at 2,000 mg  $\text{NaNO}_3\text{-N/L}$  vs. control [ $X^2_{(7)} = 940$ ;  $p \leq 0.001$ ] and all fish died at 2,800 mg  $\text{NaNO}_3\text{-N/L}$  ([Figure 1D](#)).

The calculated  $\text{LC}_{50}$  values and corresponding 95% confidence intervals for each species followed the survival trend ([Figure 2](#)). *Skiffia lermae* was the most sensitive,  $\text{LC}_{50} = 474.332$  (373.850–601.820) mg  $\text{NaNO}_3\text{-N/L}$ , followed by *X. variata*  $\text{LC}_{50} = 520.273$  (380.390–711.594) mg  $\text{NaNO}_3\text{-N/L}$ , *G. atripinnis*  $\text{LC}_{50} = 953.049$  (722.835–1256.584) mg  $\text{NaNO}_3\text{-N/L}$ , and *A. robustus*  $\text{LC}_{50} = 1537.130$  (1203.223–1963.699) mg  $\text{NaNO}_3\text{-N/L}$ .

### Swimming behavior

Swimming disorders were related to exposure time and concentration ([Tables 1, 2](#) and [Supplementary Figure 1](#)). The first alteration in *S. lermae* offspring was that they remained on the bottom of the water column at 24 h of exposure to the lowest concentration (100 mg  $\text{NaNO}_3\text{-N/L}$ ). The other three species showed surface permanence as the first alteration at 48 h of exposure to 200 mg  $\text{NaNO}_3\text{-N/L}$  in *X. variata*; while for *A. robustus* and *G. atripinnis* this occurred at 36 and 84 h of exposure to 400 mg/L, respectively ([Table 1](#)). The prevailing



behavior during acute exposure was permanence at the bottom without exploring the aquarium, but some fish also showed surface preference.

Loss of balance was related to exposure time and showed a similar trend, with *S. lermae* being more sensitive, followed by other species (Table 2 and Supplementary Figure 1). *Goodea atripinnis* did not show a loss of equilibrium at the lowest concentration.

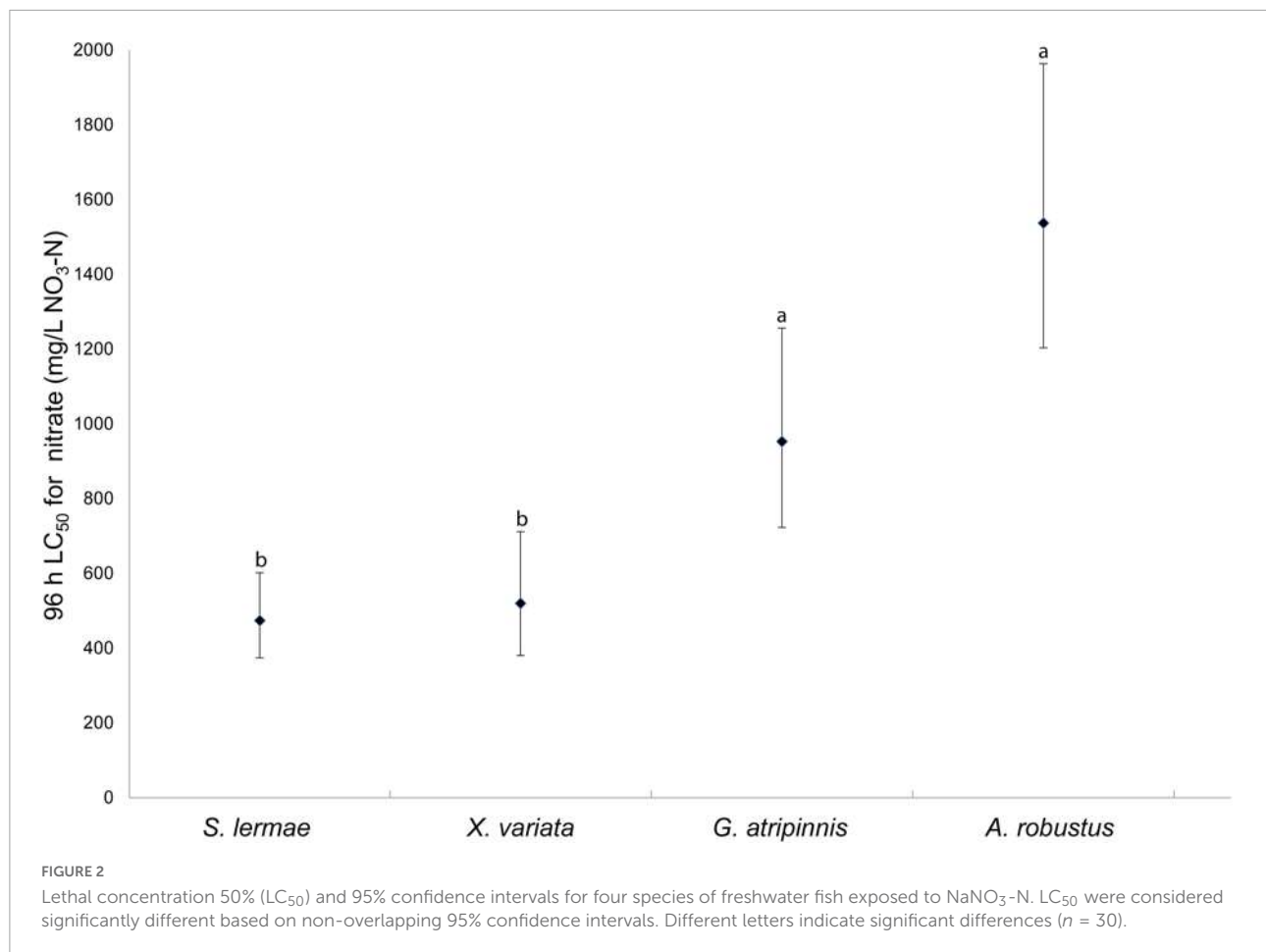
## Histological evaluation

Gill histopathological lesions integrated in the GHI showed a clear concentration-response pattern in all species (Table 3 and Figure 3). Circulatory index lesions were in a similar range; however, *G. atripinnis* was the only species that showed secondary lamellae aneurysms at the value closest to the LC<sub>50</sub> (Figure 3). Lamellae aneurysms constitute the maximal circulatory damage associated with toxic exposure ( $w = 3$  Supplementary Table 1). Secondary lamellae fusion was typical in *S. lermae* (Figure 3), where the progressive index reached the highest values ( $w = 3$

Supplementary Table 1). Cellular degeneration was observed in the gills of all fish exposed to the lethal concentration. Thus, the regressive index showed the highest values at these concentrations for each species due to branchial degeneration resulting in death ( $w = 3$  Supplementary Table 1).

In the liver, a concentration-response relationship for LHI also occurred (Table 3 and Figure 4). Vascular dilation in hepatic sinusoids occurred mainly in *S. lermae* ( $w = 1$  Supplementary Table 1), while other species showed hyperemia as circulatory liver damage (Figure 4 and  $w = 3$  Supplementary Table 1). Nuclear hypertrophy, as quantified in the progressive index ( $w = 1$  Supplementary Table 1), was frequent at those concentrations close to the LC<sub>50</sub> in all species. Hepatocyte cytoplasmic vacuolation and a relative reduction in nuclear frequency was observed in all species, especially in fish exposed to the lethal concentration, where the regressive index showed higher values than in other treatments ( $w = 3$  Supplementary Table 1).

Quantitative hepatocyte density and nuclear area analysis were performed for the LTDI (values close to 0 indicate relevant tissue damage), which showed a concentration-response pattern



(Table 3). The lowest hepatocyte density was observed at the lethal concentration, while hepatocyte nuclear area was higher at concentration closest to the LC<sub>50</sub> in all species. However, the nuclear area in *G. atripinnis* showed similar values to their respective control group (Table 3).

## Integrated biomarker response

For comprehensive evaluation, all traits analyzed were incorporated into an IBR for each species (Figure 5 and Supplementary Table 2). IBR values for each species were well weighted; control fish showed lower values and the lethal concentration had the highest score in all cases. Intercomparisons at doses closest to the LC<sub>50</sub> indicated that the most sensitive species was *S. lermæ* (IBR = 2.208), with the highest value, followed by *X. variata* (IBR = 2.124) at 400 mg NaNO<sub>3</sub>-N/L. *A. robustus* showed a higher IBR value than *G. atripinnis*; these were the most tolerant species to NaNO<sub>3</sub>. However, they differed by twice the concentration, in *G. atripinnis* it was 800 mg NaNO<sub>3</sub>-N/L (IBR = 0.977) and in *A. robustus* 1,600 mg NaNO<sub>3</sub>-N/L (IBR = 1.560). An important

factor for the IBR in tolerant species was the liver (LHI), contrary to the most sensitive species where the important factor was gill affection (GHI); swimming behavior was a promising biomarker in all species.

## Discussion

There was a clear concentration-response relationship, also dependent on time, in all exposed fish. This was evidenced by the Kaplan-Meier survival curves and their differential sensitivity. Low concentrations produced mortality in *S. lermæ* and *X. variata*, while *G. atripinnis* and *A. robustus* were more tolerant to higher NaNO<sub>3</sub>-N concentrations. The level of affection, due to NO<sub>3</sub>-N exposure, between goodeine species suggests differential tolerance. Reference parameters for NaNO<sub>3</sub>-N acute toxicity in freshwater fish offspring are consistent with the results of *G. atripinnis* and *A. robustus* (Supplementary Table 3). However, the values for *S. lermæ* and *X. variata* suggest they are the most sensitive species currently reported.

TABLE 1 Aquarium distribution.

Species	Time (h)	Concentration (mg/L)									
		0	100	200	400	800	1,200	1,600	2,000	2,400	2,800
<i>S. lermae</i>	0										
	3	–	–	–	–	/	+				
	4	–	–	–	–	/	+				
	5	–	–	–	–	/	+				
	6	–	–	–	–	/	+				
	12	–	–	–	–	/++	+				
	24	–	+	+	/++	/+++	+++				
	36	–	+	+	/++	+++	+++				
	48	–	/++	/++	+++	+++	+++				
	60	–	/++	/+++	+++	+++	+++				
	72	–	/+++	+++	+++	+++	+++				
84	–	+++	+++	+++	+++	+++					
96	–	+++	+++	+++	+++	+++				x	
<i>X. variata</i>	0			200	400	800	1,200	1,600			
	12	–		–	–	–	–	–			+
	24	–		–	+	/+	++	++			++
	36	–		–	+	++	++	++			++
	48	–		/	/++	++	++	+++			+++
	60	–		/++	/++	+++	+++	+++			+++
	72	–		/++	/++	+++	+++	+++			+++
	84	–		/+++	+++	+++	+++	+++			x
96	–		/+++	+++	+++	+++	+++			x	
<i>G. atripinnis</i>	0				400	800	1,200	1,600	2,000	2,400	
	12	–			–	–	–	–	–	–	+
	24	–			–	/+	/+	/+++	/+++	+++	+++
	36	–			–	/+	/++	/+++	/+++	+++	+++
	48	–			–	/+	/+++	+++	+++	+++	+++
	60	–			–	/+	/+++	+++	+++	+++	+++
	72	–			–	/+	/+++	+++	+++	+++	+++
	84	–			/	/++	/+++	+++	+++	+++	+++
96	–			/+	/++	+++	+++	+++	+++	x	
<i>A. robustus</i>	0				400	800	1,200	1,600	2,000	2,400	2,800
	5	–			–	–	–	–	–	–	/
	6	–			–	–	–	–	–	–	/+
	12	–			–	–	–	–	/	/	++
	24	–			–	–	–	/+	+++	+++	+++
	36	–			/	/	/+	/+	+++	+++	+++
	48	–			/	/++	/+++	/+++	+++	+++	+++
	60	–			/+	/++	/+++	/+++	+++	+++	+++
	72	–			/+++	/+++	+++	+++	+++	+++	x
	84	–			/+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
96	–			/+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	

Swimming behavior was recorded every hour during the six first hours; however, only the times when unusual behaviors were observed are shown, *n* = 30. Normal behavior in all fish (–); low affectation, unusual behavior was observed in 10–33% of the population (/top, + bottom); moderate affectation, 34–63% (/top, ++bottom); high affectation, 64–100% (/top, +++bottom); all individuals dead (x).

TABLE 2 Loss of equilibrium.

Species	Time (h)	Concentration (mg/L)									
		0	100	200	400	800	1,200	1,600	2,000	2,400	2,800
<i>S. lermae</i>	0										
	24	–	–	–	–	++	++				
	36	–	–	–	+	++	+++				
	48	–	–	–	++	+++	+++				
	60	–	–	+	++	+++	+++				
	72	–	+	+	++	+++	+++				
	84	–	+	+	++	+++	+++				
	96	–	+	+	++	+++	+++	x			
<i>X. variata</i>	0			200	400	800	1,200	1,600			
	24	–		–	–	+	++	++			
	36	–		–	–	++	++	+++			
	48	–			++	++	+++	+++			
	60	–		++	++	++	+++	+++			
	72	–		++	++	++	+++	+++			
	84	–		++	+++	+++	+++	+++			
	96	–		++	+++	+++	+++	+++	x		
<i>G. atripinnis</i>	0				400	800	1,200	1,600	2,000	2,400	
	24	–			–	++	+	++	++	++	
	36	–			–	++	++	++	+++	+++	
	48	–			–	++	++	+++	+++	+++	
	60	–			–	++	+++	+++	+++	+++	
	72	–			–	++	+++	+++	+++	+++	
	84	–			–	++	+++	+++	+++	+++	
	96	–			–	++	+++	+++	+++	+++	x
<i>A. robustus</i>	0				400	800	1,200	1,600	2,000	2,400	2,800
	24	–			–	–	–	–	+	++	++
	36	–	–		–	–	–	–	++	++	++
	48	–			–	+	++	++	+++	+++	+++
	60	–			–	++	++	++	+++	+++	+++
	72	–			++	++	+++	+++	+++	+++	x
	84	–			++	+++	+++	+++	+++	+++	
	96	–			+++	+++	+++	+++	+++	+++	

Swimming behavior was recorded every hour during the six first hours; however, only the times when unusual behaviors were observed are shown, *n* = 30. Normal swimming in all fish (–); low affectation, loss of equilibrium was observed in 10–33% of the population (+); moderate affectation, 34–63% of fishes showed loss of equilibrium and some swam laterally (++); high affectation, 64–100% of fishes swam laterally (+++); all individuals dead (x).

### Sensitivity, ontogenetic stage, and body size

Fish responses to NO<sub>3</sub>-N depend on adsorption (accumulation time in plasma), distribution, metabolism, and excretion (Spurgeon et al., 2020). A relationship between sensitivity and ontogenetic stage has been found. Hamlin (2006) suggested that offspring were more tolerant to elevated NO<sub>3</sub>-N than adults, contrary to other studies where earlier life stages were more sensitive (Adelman et al., 2009). Also, species with a bigger body size are less sensitive to NO<sub>3</sub>-N (Camargo

et al., 2005). In fact, a recent study in relatively larger species found that low NO<sub>3</sub>-N concentrations did not alter growth and reproduction (Syed et al., 2022).

In this study, the four Goodeinae species had the same age during NaNO<sub>3</sub>-N exposure but differed in body size and developmental stage. *Skiffia lermae* was the smallest species, followed by *X. variata*, while *G. atripinnis* and *A. robustus* were the largest species. Likewise, *S. lermae* have earlier maturation and begin their reproductive life approximately 3 months after birth (body length: 29.5 ± 5.7 mm in females and 25.2 ± 5.4 mm in males. Ramírez-García et al., 2021). In contrast, *G. atripinnis*

TABLE 3 Gill (GHI) liver histopathological (LHI) and tissue damage indexes (LTDI) of fish exposed to NaNO<sub>3</sub>-N (control, concentration closest to the LC<sub>50</sub> and LC<sub>100</sub>), n = 3.

Species	NaNO <sub>3</sub> -N conc. (mg/L)	Circulatory index	Progressive index	Regressive index	GHI	Circulatory index	Progressive index	Regressive index	LHI	Nuclear area (μm <sup>2</sup> )	No. of cell nuclei/mm <sup>2</sup>	LTDI
<i>S. lermiae</i>	Control	2.400 ± 0.305	2.000 ± 0.721	0.000 ± 0.000	4.400	0.333 ± 0.066	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.333	13.454 ± 0.247	10319.783 ± 108.477	1.092 <sup>a</sup>
	400 mg/L	2.133 ± 0.290	13.266 ± 1.987	0.466 ± 0.133	15.866	3.133 ± 0.290	2.000 ± 0.230	2.866 ± 0.480	8.000	18.785 ± 0.295	6834.688 ± 63.488	0.864 <sup>c</sup>
	1,200 mg/L	1.200 ± 0.115	6.066 ± 1.576	11.200 ± 1.101	18.466	3.666 ± 0.133	0.333 ± 0.133	16.600 ± 0.901	20.600	8.919 ± 0.230	922.927 ± 22.645	0.272 <sup>f</sup>
<i>X. variata</i>	Control	3.333 ± 0.333	0.733 ± 0.176	0.000 ± 0.000	4.066	0.266 ± 0.066	0.000 ± 0.000	0.333 ± 0.066	0.600	13.179 ± 0.130	9975.610 ± 104.509	1.048 <sup>ab</sup>
	400 mg/L	4.200 ± 0.461	6.600 ± 0.808	1.066 ± 0.405	11.866	1.400 ± 0.115	0.733 ± 0.290	7.400 ± 0.611	9.533	16.724 ± 0.282	6325.203 ± 65.854	0.788 <sup>d</sup>
<i>G. atripinnis</i>	1,600 mg/L	1.533 ± 0.240	4.133 ± 1.634	12.333 ± 0.940	18.000	2.333 ± 0.480	0.333 ± 0.066	14.266 ± 3.090	16.933	14.273 ± 0.308	2128.211 ± 123.568	0.316 <sup>f</sup>
	Control	2.666 ± 0.437	1.200 ± 0.400	0.000 ± 0.000	3.866	0.466 ± 0.066	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.466	12.433 ± 0.170	11761.518 ± 97.938	1.067 <sup>a</sup>
	800 mg/L	5.333 ± 1.550	2.800 ± 0.808	1.133 ± 0.333	9.266	1.866 ± 0.240	2.266 ± 0.176	2.333 ± 0.176	6.466	13.398 ± 0.187	10883.469 ± 114.483	0.999 <sup>b</sup>
<i>A. robustus</i>	2,400 mg/L	2.800 ± 0.721	10.133 ± 0.437	7.933 ± 1.87	20.866	2.600 ± 0.230	0.333 ± 0.133	8.866 ± 1.964	11.800	10.736 ± 0.275	3989.807 ± 290.373	0.458 <sup>e</sup>
	Control	2.600 ± 0.305	0.533 ± 0.133	0.000 ± 0.000	3.133	0.266 ± 0.066	0.000 ± 0.000	0.400 ± 0.115	0.666	11.816 ± 0.159	8119.241 ± 117.643	1.064 <sup>a</sup>
	1,600 mg/L	2.533 ± 0.290	2.466 ± 0.896	1.533 ± 0.176	6.533	0.933 ± 0.133	1.466 ± 0.133	5.000 ± 1.514	7.400	16.470 ± 0.204	5349.593 ± 86.609	0.858 <sup>c</sup>
	2,800 mg/L	1.866 ± 0.240	3.933 ± 0.768	11.466 ± 0.835	17.266	1.466 ± 0.466	1.00 ± 0.230	9.000 ± 0.986	11.466	12.501 ± 0.205	3371.274 ± 36.225	0.501 <sup>e</sup>

Superscript letters indicate statistical differences (Kruskal-Wallis-test with Tukey's range post-hoc test, p ≤ 0.05).

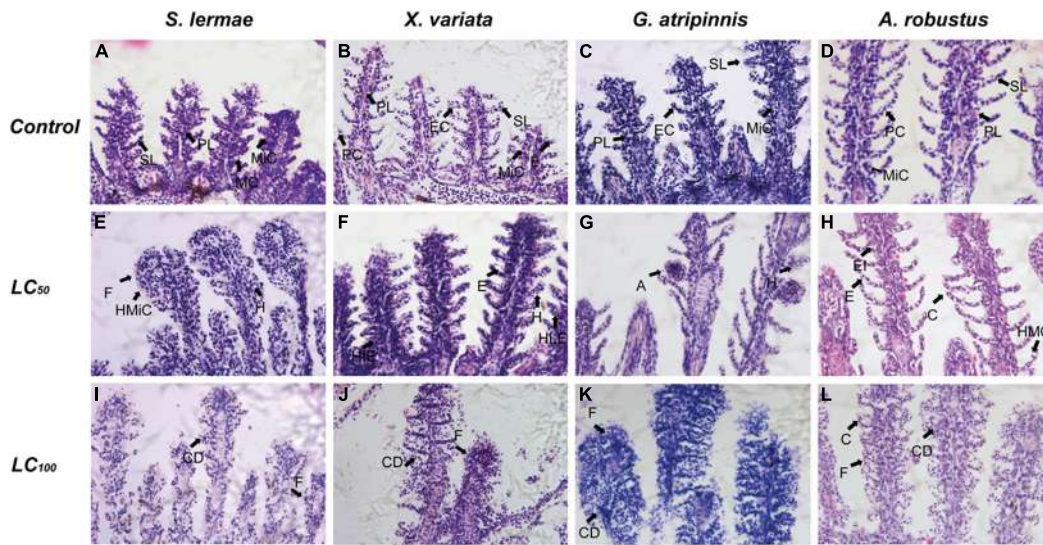
start its reproductive stage at 8 months (Silva-Santos et al., 2016), with a body length of 65.8 ± 17.6 mm in females and 65.6 ± 20.7 mm in males (Ramírez-García et al., 2021). Thus, the smallest and most precocious species were the most sensitive, while more tolerant responses were found in larger species.

### Swimming behavior reflects differential sensitivity to nitrate-nitrogen

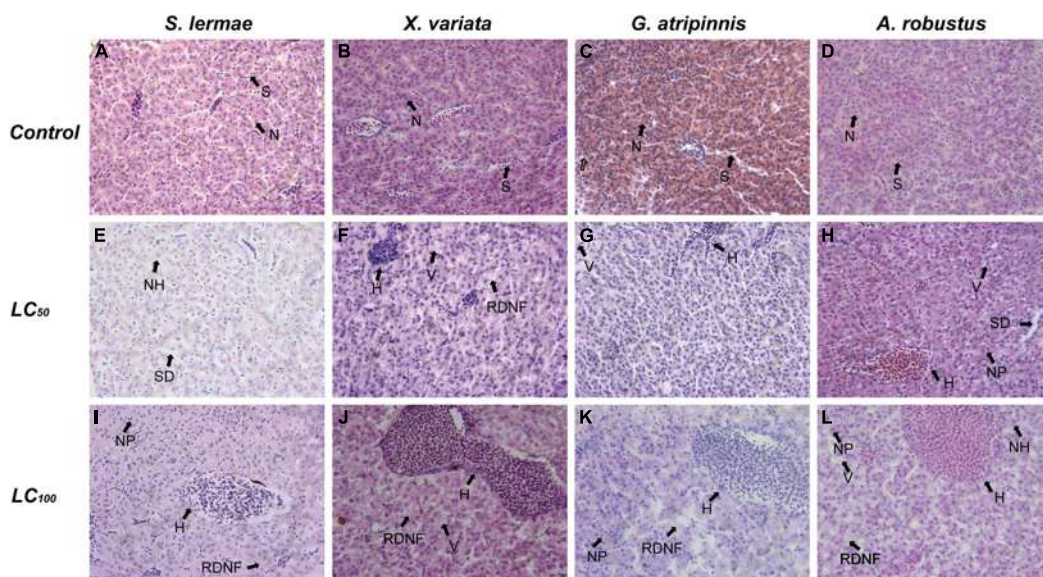
Swimming behavior alterations have been considered as an attempt to face unfavorable environmental conditions, from the regular swimming pattern that occurs in the middle of the water column (Gerhardt, 2007). The behavioral patterns observed in response to acute NaNO<sub>3</sub>-N were: location on the surface or bottom of the water column, loss of balance and lethargy. *Skiffia lermiae* showed swimming behavior alterations earlier and at lower NaNO<sub>3</sub>-N concentrations, followed by *X. variata*, *A. robustus*, and *G. atripinnis*. Permanence in the surface of the water column is a compensatory response to inefficient oxygen uptake caused by damage to the gills or by conversion of oxygen-carrying pigments (i.e., hemoglobin) to forms that are incapable of carrying oxygen (i.e., methemoglobin Camargo and Alonso, 2006). Loss of balance and position at the bottom of the water column have been associated with a decreased capacity for respiratory gas exchange, as well as with the depletion of liver lipid reserves (Pereira et al., 2017). Other studies have reported a loss of balance and lethargy in fish exposed to NO<sub>3</sub>-N (Shimura et al., 2004; Hamlin, 2006; Rodrigues et al., 2011; Pereira et al., 2017).

### Histopathological alterations of gills and liver could reflect different sensitivity to nitrate-nitrogen in goodeine species

Remarkably, the LC<sub>50</sub> value for *A. robustus* is similar to *C. clupeaformis* and *O. mykiss*, two euryhaline species having proficient ion exchange regulation to tolerate changes between freshwater and marine environments (Camargo et al., 2005; Takvam et al., 2021). This is interesting given that the gills are one of the main organs involved in ion regulation and ammonia excretion, where specific glycoproteins are involved (Hwang et al., 2011). At the histological level, *A. robustus* showed preserved gill structure after NaNO<sub>3</sub>-N exposure. This suggests that gill function is maintained due to regressive, progressive and circulatory alterations restricted to the apical region. This was contrary to *S. lermiae* which showed significant damage (highest GHI at minor concentrations), mainly lamellar fusion and cell hyperplasia; or *X. variata* and *G. atripinnis* which showed moderate gill



**FIGURE 3**  
 Effect of acute exposure to NaNO<sub>3</sub>-N on gill histology of four goodeine species. Representative photomicrographs of gill sections stained with hematoxylin and eosin from control (A–D), concentration closest to the LC<sub>50</sub> (E–H) and LC<sub>100</sub> (I–L) groups. A, Aneurysm of secondary lamellae; C, Change in curvature of secondary lamellae; CD, Cellular degeneration; E, Edema of secondary lamellae; EC, Epithelial cell; EI, Edema of interlamellar epithelium; F, Fusion of secondary lamellae; H, Hyperemia of secondary lamellae; HLE, Hyperplasia of lamellar epithelium; HMC, Mucus cell hyperplasia; HMiC, Mitochondria-rich cell hyperplasia; PL, Primary lamellae; SL, Secondary lamellae; MC, Mucus cell; MiC, Mitochondria-rich cell; PC, Pillar cell.



**FIGURE 4**  
 Effect of acute exposure to NaNO<sub>3</sub>-N on liver histology of four goodeine species. Representative photomicrographs of liver sections stained with hematoxylin and eosin from control (A–D), concentration closest to the LC<sub>50</sub> (E–H) and LC<sub>100</sub> (I–L) groups. H, Hyperemia; N, hepatocyte nucleus; NH, Nuclear hypertrophy; NP, nuclear pyknosis; RDNF, Relative decrease of nuclei frequency; S, sinusoid; SD, Blood sinusoid dilation; V, Vacuolation of the cytoplasm.

alterations, like edema and aneurysms. Gill histopathological alterations in response to water conditions and pollutants, including NO<sub>2</sub>-N, have been described (Kroupova et al., 2005). The gills play a critical physiological role in nitrogenous

waste detoxification; however, the response to NO<sub>3</sub>-N has not been fully explained (Gomez-Isaza et al., 2020). The branchial epithelium responds to non-optimal environmental changes through circulatory and progressive alterations oriented

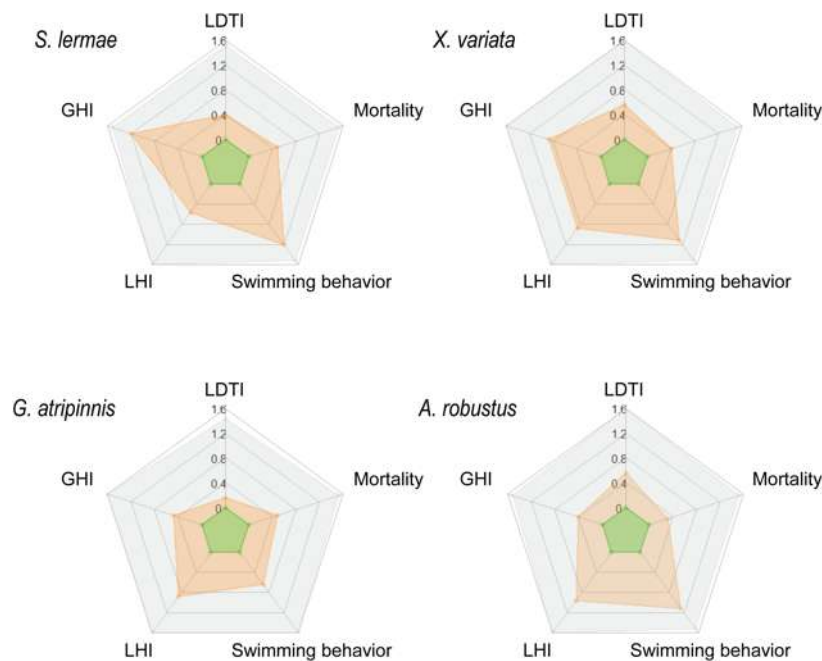


FIGURE 5

Integrated biomarker response (IBR) for four goodeine species exposed to  $\text{NaNO}_3\text{-N}$ . Radar graphs show the calculated IBR for *S. lermae*, *X. variata*, *G. atripinnis*, and *A. robustus* from the control condition (green), exposed to the concentration closest to the  $\text{LC}_{50}$  (orange) and  $\text{LC}_{100}$  (gray). The spokes of the radar indicate all traits evaluated: mortality and swimming behavior, as well as gill (GHI), liver histopathological (LHI), and tissue damage indexes (LDTI).

to preserve gill function. If ecological conditions remain unfavorable, degenerative mechanisms like lamellar fusion are triggered leading to loss of gill function (Antunes et al., 2017; Monsees et al., 2017). Thus, lamellar fusion observed in *S. lermae* fry could lead to ion-exchange failure and consequent fish anoxia. The different degrees of gill tissue damage observed in *X. variata*, *G. atripinnis*, and *A. robustus* suggest different mechanisms to face  $\text{NO}_3\text{-N}$  exposure.

Liver histopathology also confirmed differential tolerance due to variation in circulatory, progressive and regressive alterations. These constitute the LHI, which showed similar values between species. *Xenotoca variata* and *A. robustus* showed the highest regressive index associated with hepatocyte cytoplasmic vacuolation, pyknosis, and a relative decrease in nuclear density. Meanwhile, *S. lermae* and *G. atripinnis* showed circulatory and progressive alterations, respectively. The liver has an essential role in metabolic pathways and pollutant detoxification (Bruslé and Anadon, 1996). Exposure to environmental pollutants could result in erythrocyte accumulation in sinusoids (hyperemia), vascular dilation and hemorrhage, as well as hepatocyte hypertrophy. The degenerative indicators were hepatocyte cytoplasmic vacuolation, pyknosis, and decreased nuclear density. An increased size of hepatocyte nuclei (nuclear hypertrophy) reveals higher transcriptional and metabolic activity in response to pollutants. In contrast, a decreased cell density is related to

liver degeneration (Strüssmann and Takashima, 1990). Here the hepatocyte nuclear area and number of cell nuclei were quantified and integrated into the LDTI. All species showed an increased cell nuclear area and a decreased number of cell nuclei. However, *X. variata* presented the highest liver damage, followed by *A. robustus* and *S. lermae*, whereas *G. atripinnis* showed less liver damage.

Combined histopathological evaluation suggested that gill and liver damage were associated with alteration of critical metabolic processes, such as inhibition of protein synthesis, depletion of glycogen reserves and reduced ability to detoxify environmental pollutants (Mohamed, 2009). In this regard, *S. lermae* showed the most severe gill damage and a relatively well-preserved liver structure. On the contrary, *X. variata* showed a high GHI and the highest LHI, whereas *G. atripinnis* and *A. robustus* showed lower GHI and LHI. Interestingly, *G. atripinnis* showed a higher GHI than *A. robustus* but a lower LHI. This supports the hypothesis that species that preserve gill structure and function, letting the liver carry out detoxification, likely have better survival opportunities. It has been demonstrated that lamellar fusion in response to acute  $\text{NO}_3\text{-N}$  exposure limits the absorption of toxic substances and inhibits ion exchange (Monsees et al., 2017).

The inclusion of all evaluated responses into IBR radar graphs allowed identifying the GHI, LHI, and swimming behavior as the main factors that contribute to explain the differential sensitivity of Goodeinae species to  $\text{NO}_3\text{-N}$ . Sensitive

species (*S. lermae* and *X. variata*) showed similar IBR values at the concentration closest to the LC<sub>50</sub>, the first species showed the most severe gill damage. A certain tolerance level to NO<sub>3</sub>-N exposure was found in *G. atripinnis* and *A. robustus* species which could be related to the activation of physiological detoxifying strategies for survival. In both tolerant species, gill damage was minor, suggesting that fish species showing gill NO<sub>3</sub>-N tolerance have higher survival opportunities in polluted freshwater bodies.

The results show that NO<sub>3</sub>-N are toxic since they produce behavioral, branchial, and hepatic alterations at a lower concentration in goodeines. Thus, it is recommended that their concentrations be monitored in freshwater bodies where goodeines inhabit. Their toxic effect may be increased by alterations in other water quality parameters like pH, hardness, and temperature. In this study, most water quality variables were close to Zacapu lake parameters; except salinity, TDS and conductivity, which are directly associated with the sodium ions in solution. Due to the large difference in progeny between species (*S. lermae* and *X. variata* females produce a mean of 12 and 38 hatchlings, respectively; whereas *G. atripinnis* and *A. robustus* females produce larger progeny of up to 150 offspring. Ramírez-García et al., 2021), this study evaluated offspring from a different number of gravid females. These differences in fecundity between goodeine species, in addition to differential sensitivity to NaNO<sub>3</sub>-N, could increase the ecological risk for *S. lermae* and *X. variata* in wild freshwater ecosystems. However, population comparisons were outside the scope of this study.

## Conclusion

Goodeinae species show a differential NaNO<sub>3</sub>-N sensitivity. Since the most sensitive species showed higher gill damage, differential sensitivity could be related to different physiological mechanisms to face NO<sub>3</sub>-N. Thus, species that preserve gill function and transfer the task of detoxification to the liver might have the best chance of surviving in polluted environments. Future studies should evaluate ecologically relevant NO<sub>3</sub>-N concentrations to confidently predict goodeines persistence in polluted freshwater bodies.

## Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by the Mexican Ministry of Environmental and Natural Resources

(SEMARNATSGPA/DGVS/00012/19) and the Secretariat of Agriculture and Rural Development (SAGARPA: PPF/DGOPA-014/20).

## Author contributions

IV-V: investigation, methodology, formal analysis, and writing—original draft. BY-R: formal analysis and writing—review and editing. RR-J: conceptualization and methodology. MH-V and RH-M: methodology. OD-D: funding acquisition, conceptualization, and writing—review and editing. EM-H: funding acquisition, data curation, writing—original draft, and writing—review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

This work was supported by the Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH to EM-H and OD-D and Chester Zoo Garden, Association Beauval Nature Pour la Conservation et la Recherche, Willema Zoo, Ostrava Zoo, The Mohammed Bin Zayed Species Conservation Found, Haus des Meeres—Aqua Terra Zoo, Poecilia Scandinavia, zoologische gesellschaft für arten- und populationschutz, Goodeid Working Group, American Livebearers Association to OD-D. IV-V was Ph.D. fellow from CONACYT (grant no. 743476).

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2022.1014814/full#supplementary-material>

## References

- Adelman, I., Kusilek, L., Koehle, J., and Hess, J. (2009). Acute and chronic toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the endangered topeka shiner (*Notropis topeka*) and fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2216–2223. doi: 10.1897/08-619.1
- American Public Health Association [APHA] (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 23rd Edn. Washington, DC: APHA.
- Antunes, A., Rocha, T., Pires, F., de Freitas, M., Leite, V., Arana, S., et al. (2017). Gender-specific histopathological response in guppies *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate or its metabolite aminomethylphosphonic acid. *J. Appl. Toxicol.* 37, 1098–1107. doi: 10.1002/jat.3461
- Bancroft, J., and Cook, H. (1994). *Manual of histological techniques and their diagnostic application*. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., and Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25–34. doi: 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x
- Bertrand, L., Asis, R., Monferrán, M., and Amé, M. (2016). Bioaccumulation and biochemical response in South American native species exposed to zinc: Boosted regression trees as novel tool for biomarkers selection. *Ecol. Indic.* 67, 769–778. doi: 10.1016/j.ecolind.2016.03.048
- Bruslé, J., and Anadon, G. (1996). “The structure and function of fish liver,” in *Fish Morphology*, eds J. Munshi and H. Dutta (North-Holland: Science Publishers), 77–93. doi: 10.1016/j.ecolind.2016.03.048
- Camargo, J., and Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ. Int.* 32, 831–849. doi: 10.1016/j.envint.2006.05.002
- Camargo, J., Alonso, A., and Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: A review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58, 1255–1267. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.10.044
- Cano-Rocabayera, O., Sostoa, A., Padrós, F., Cárdenas, L., and Maceda-Veiga, A. (2019). Ecologically relevant biomarkers reveal that chronic effects of nitrate depend on sex and life stage in the invasive fish *Gambusia holbrooki*. *PLoS One* 14:e0211389. doi: 10.1371/journal.pone.0211389
- Corredor-Santamaría, W., Mora-Solarte, D., Arbeli, Z., Navas, J., and Velasco-Santamaría, J. (2021). Liver biomarkers response of the neotropical fish *Aequidens metae* to environmental stressors associated with the oil industry. *Heliyon* 7, 1–8. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07458
- Dominguez-Dominguez, O., Martínez-Meyer, E., Zambrano, L., and De León, G. (2006). Using ecological-niche modeling as a conservation tool for freshwater species: Live-bearing fishes in central Mexico. *Conserv. Biol.* 20, 1730–1739. doi: 10.1111/j.1523-1739.2006.00588.x
- Dominguez-Dominguez, O., Zambrano, L., Escalera-Vázquez, L., Pérez-Rodríguez, R., and Pérez-Ponce de León, G. (2008). Cambio en la distribución de Goodeidos (Osteichthyes: Cyprinodontiformes: Goodeidae) en cuencas hidrológicas del centro de México. *Rev. Mex. Biodivers.* 79, 501–512.
- Du, R., Cao, S., Peng, Y., Zhang, H., and Wang, S. (2019). Combined partial denitrification (PD)-anammox: A method for high nitrate wastewater treatment. *Environ. Int.* 126, 707–716. doi: 10.1016/j.envint.2019.03.007
- Duncan, J., and Lockwood, J. (2001). Extinction in a field of bullets: A search for causes in the decline of the world's freshwater fishes. *Biol. Conserv.* 102, 97–105. doi: 10.1016/S0006-3207(01)00077-5
- Dutra, F., Cidemar Alab, J., Costa Gómez, M., Furtado, P., Valenti, W., and Cupertino-Ballester, E. (2020). Nitrate acute toxicity to post larvae and juveniles of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). *Chemosphere* 242:125229. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125229
- Emam, M., Caballero-Solares, A., Xue, X., Umasuthan, N., Milligan, B., Taylor, R., et al. (2022). Gill and liver transcript expression changes associated with gill damage in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Front. Immunol.* 13:806484. doi: 10.3389/fimmu.2022.806484
- Foster, K., and Piller, K. (2018). Disentangling the drivers of diversification in an imperiled group of freshwater fishes (Cyprinodontiformes: Goodeidae). *BMC Evol. Biol.* 18:116. doi: 10.1186/s12862-018-1220-3
- Galloway, J., Denterner, F., Capone, D., Boyer, E., Haowarth, R., Seitzinger, S., et al. (2004). Nitrogen cycles: Past, present, and future. *Biogeochemistry* 70, 153–226. doi: 10.1007/s10533-004-0370-0
- Gerhardt, A. (2007). Aquatic behavioral ecotoxicology-prospects and limitations. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 13, 481–491. doi: 10.1080/10807030701340839
- Goeller, B., Febria, C., Warburton, H., Hogsdon, K., Collins, K., Devlin, H., et al. (2019). Springs drive downstream nitrate export from artificially-drained agricultural headwater catchments. *Sci. Total Environ.* 671, 119–128. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.308
- Gomez-Isaza, D., Cramp, R., and Franklin, C. (2018). Negative impacts of elevated nitrate on physiological performance are not exacerbated by low pH. *Aquat. Toxicol.* 200, 217–225. doi: 10.1016/j.aquatox.2018.05.004
- Gomez-Isaza, D., Cramp, R., and Franklin, C. (2020). Living in polluted waters: A meta-analysis of the effects of nitrate and interactions with other environmental stressors on freshwater taxa. *Environ. Pol.* 261, 1–12. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114091
- Gomez-Isaza, D., Cramp, R., and Franklin, C. (2021). Exposure to Nitrate Increases Susceptibility to Hypoxia in Fish. *Physiol. Biochem. Zool.* 94, 124–142. doi: 10.1086/713252
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996). *National research council of the National Academies*, 8th Edn. (Washington, DC: The National Academies Press), 246.
- Guillette, L., and Edwards, T. (2005). Is nitrate an ecologically relevant endocrine disruptor in vertebrates? *Integr. Comp. Biol.* 45, 19–27. doi: 10.1093/icb/45.1.19
- Hamlin, H. (2006). Nitrate toxicity in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Aquaculture* 253, 688–693. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.08.025
- Hwang, P., Lee, T., and Lin, L. (2011). Ion regulation in fish gills: Recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301, 28–47. doi: 10.1152/ajpregu.00047.2011
- Iida, A., Arai, H., Someya, Y., Inokuchi, M., Onuma, T., Yokoi, H., et al. (2019). Mother-to-embryo vitellogenin transport in a viviparous teleost *Xenotoca eiseni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 22359–22365. doi: 10.1073/pnas.1913012116
- IUCN (2022). *The IUCN red list of threatened species. Version 2021-3*. Available online at: <https://www.iucnredlist.org> (accessed May 15, 2022).
- Kim, J., Kang, Y., Kim, K., Kim, S., and Kim, J. (2019). Toxic effects of nitrogenous compounds (ammonia, nitrite, and nitrate) on acute toxicity and antioxidant responses of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 67, 73–78. doi: 10.1016/j.etap.2019.02.001
- Kroupova, K., Máčková, J., and Svobodova, Z. (2005). Nitrite influence on fish: A review. *Vet. Med.* 50, 461–471.
- Lyons, J., Piller, K., Artigas-Azas, J., Dominguez-Dominguez, O., Gesundheit, P., Köck, et al. (2019). Distribution and current conservation status of the Mexican Goodeidae (Actinopterygii, Cyprinodontiformes). *ZooKeys* 885, 115–158. doi: 10.3897/zookeys.885.38152
- McGurk, M., Landry, F., Tang, A., and Hanks, C. (2006). Acute and chronic toxicity of nitrate to early life stages of lake trout (*Salvelinus namaycush*) and lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2187–2196. doi: 10.1897/05-270r.1
- Miller, R., Minckley, W., and Norris, S. (2009). *Freshwater fishes of Mexico*. Chicago, IL: University of Chicago Press.
- Mohamed, F. (2009). Histopathological studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from Lake Qarun, Egypt. *World J. Fish Mar. Sci.* 1, 29–39.
- Monsees, H., Klatt, L., Kloas, W., and Wuertz, S. (2017). Chronic exposure to nitrate significantly reduces growth and affects the health status of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in recirculating aquaculture systems. *Aquac. Res.* 48, 3482–3492. doi: 10.1111/are.13174
- Ogueji, O., Nwani, C., Iheanacho, S., Mbah, C., Okeke, C., and Yaji, A. (2018). Acute toxicity effects of ibuprofen on behaviour and haematological parameters of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Afr. J. Aquat. Sci.* 43, 293–303. doi: 10.2989/16085914.2018.1465393
- OECD (2019). *Test No. 203: Fish, acute toxicity test, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 2*. Paris: OECD Publishing.
- Pereira, A., Carvalho, A., Cruz, C., and Saraiva, A. (2017). Histopathological changes and zootechnical performance in juvenile zebrafish (*Danio rerio*) under chronic exposure to nitrate. *Aquaculture* 473, 197–205. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.02.018
- Presla, L., Neves, G., Maltez, L., Sampaio, L., Monserrat, J., Copatti, C., et al. (2022). Acute and sub-lethal effects of nitrate on haematological and oxidative stress parameters of juvenile mullet (*Mugil liza*) in freshwater. *Aquac. Res.* 53, 3346–3357. doi: 10.1111/are.15842
- R Core Team (2022). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

- Ramírez-García, A., Domínguez-Domínguez, O., López-López, E., Moncayo-Estrada, R., and Cruz-Aguero, J. (2022). Temporal changes in the fish community structure of a small subtropical spring lake: Decadal and seasonal analysis. *Ecol. Freshw. Fish.* [Epub ahead of print]. doi: 10.1111/eff.12669
- Ramírez-García, A., Moncayo-Estrada, R., González-Cárdenas, J. J., and Domínguez-Domínguez, O. (2021). Reproductive cycle of native viviparous fish species (Actinopterygii: Cyprinodontiformes: Goodeidae) in a subtropical Mexican lake. *Neotrop. Ichthyol.* 19, 1–20. doi: 10.1590/1982-0224-2021-0105
- Rodrigues, R., Saturnino, K., and Fernandes, C. (2017). Liver histology and histomorphometry in hybrid sorubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* × *Pseudoplatystoma corruscans*) reared on intensive fish farming. *Aquac. Res.* 48, 5083–5093. doi: 10.1111/are.13325
- Rodrigues, R., Schwarz, M., Delbos, B., Carvalho, E., Romano, L., and Sampaio, L. (2011). Acute exposure of juvenile cobia *Rachycentron canadum* to nitrate induces gill, esophageal and brain damage. *Aquaculture* 322–323, 223–226. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.09.040
- Rueda-Jasso, R., De los Santos-Bailón, A., and Campos-Mendoza, A. (2017). Nitrite toxicity in juvenile Goodeinae fishes *Skiffia multipunctata* (Pellegrin, 1901) and *Goodea atripinnis* (Jordan, 1880). *J. Appl. Ichthyol.* 33, 300–305. doi: 10.1111/jai.13292
- Santos, R., Monteiro, S., Cortes, R., Pacheco, F., and Fernandes, L. (2022). Seasonal differences in water pollution and liver histopathology of Iberian Barbel (*Luciobarbus bocagei*) and Douro Nase (*Pseudochondrostoma duriense*) in an Agricultural Watershed. *Water* 14, 1–22. doi: 10.3390/w14030444
- Schram, E., Roques, J., Abbink, W., Yokohama, Y., Spannings, T., de Vries, P., et al. (2012). The impact of elevated water nitrate concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquac. Res.* 45, 1499–1511. doi: 10.1111/are.12098
- Shimura, R., Ma, Y., Ijiri, K., Nagaoka, S., and Uchiyama, M. (2004). Nitrate toxicity on visceral organs of Medaka fish, *Oryzias latipes*: Aiming to raise fish from egg to egg in space. *Biol. Sci. Space* 18, 7–12. doi: 10.2187/bss.18.7
- Silva-Santos, J., Martínez-Saldaña, M., Rico-Martínez, R., Gómez, J., and Arredondo-Figueroa, J. (2016). Reproductive biology of *Goodea atripinnis* (Jordan, 1880) (cyprinodontiformes: goodeidae) under controlled conditions. *J. Exp. Biol. Agric. Sci.* 4, 180–193. doi: 10.18006/2016.4(2)0.180.193
- Spurgeon, D., Lahive, E., Robinson, A., Short, S., and Kille, P. (2020). Species sensitivity to toxic substances: Evolution, ecology and applications. *Front. Environ.* 8:588380. doi: 10.3389/fevs.2020.588380
- Strüssmann, C., and Takashima, F. (1990). Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). *J. Fish Biol.* 36, 59–65. doi: 10.1111/j.1095-8649.1990.tb03519.x
- Syed, R., Masood, Z., Hassan, H., Khan, W., Mushtaq, S., Ali, A., et al. (2022). Growth performance, haematological assessment and chemical composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fed different levels of Aloe vera extract as feed additives in a closed aquaculture system. *Saudi J. Biol. Sci.* 29, 296–303. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.08.098
- Takvam, M., Wood, C., Kryvi, H., and Nilsen, T. (2021). Ion transporters and osmoregulation in the kidney of teleost fishes as a function of salinity. *Front. Physiol.* 12:664588. doi: 10.3389/fphys.2021.664588
- Torno, J., Einwächter, V., Schroeder, J., and Schulz, C. (2018). Nitrate has a low impact on performance parameters and health status of on-growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in RAS. *Aquaculture* 489, 21–27. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.01.043
- Tramunt, B., Montagner, A., Tan, N., Gourdy, P., Réminon, H., and Wahli, W. (2021). Roles of estrogens in the healthy and diseased oviparous vertebrate liver. *Metabolites* 11:502. doi: 10.3390/metabo11080502
- van Bussel, C., Schroeder, J., Wuertz, S., and Schulz, C. (2012). The chronic effect of nitrate on production performance and health status of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 326–329, 163–167. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.11.019
- Yang, X., Song, X., Peng, L., Hallerman, E., and Huang, Z. (2019). Effects of nitrate on aquaculture production, blood and histological markers and liver transcriptome of *Oplegnathus punctatus*. *Aquaculture* 501, 387–396. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.11.048
- Yu, J., Wang, Y., Xiao, Y., Li, X., Zhou, L., Wang, Y., et al. (2021). Investigating the effect of nitrate on juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) growth performance, health status, and endocrine function in marine recirculation aquaculture systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208:111617. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111617

**CAPÍTULO II: Realistic nitrate concentrations diminish  
reproductive indicators in *Skiffia lermæ*, an endemic species in  
critical status.**

Para someter a Ecological Indicators

**Realistic nitrate concentrations diminish reproductive indicators in *Skiffia lermæ*, an endemic species in critical status**

Ivette Marai Villa-Villaseñor<sup>1\*</sup>, Ma. Antonia Herrera-Vargas<sup>2</sup>, Beatriz Yáñez-Rivera<sup>3</sup>, Mari Carmen Uribe<sup>4</sup>, Bryan Víctor Phillips-Farfán<sup>5</sup>, Valentin Mar-Silva<sup>6</sup>, Esperanza Meléndez-Herrera<sup>2\*</sup> and Omar Domínguez-Domínguez<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, C.P. 58030. Morelia, Michoacán, México. 0620850k@umich.mx

<sup>2</sup> Laboratorio de Ecofisiología animal, Instituto de Investigaciones sobre Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Av. San Juanito Itzícuaró s/n, Colonia Nueva Esperanza, C.P. 58337. Morelia, Michoacán, México. antonia.herrera@umich.mx, emelendez@umich.mx

<sup>3</sup> Unidad Académica Mazatlán, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Joel Montes Camarena s/n, Mazatlán, C.P. 82040. Sinaloa, México. beyariv@ola.icmyl.unam.mx

<sup>4</sup> Laboratorio de Biología de la Reproducción Animal, Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510. México D.F., México. mari3uribe3@gmail.com

<sup>5</sup> Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700, Letra C, Alcaldía Coyoacán, C.P. 04530. Cd. de México, México.

<sup>6</sup> Estancia Posdoctoral por México-CONACyT. Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia, Universidad Nacional Autónoma de México. Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701. Col. Ex Hacienda de San José de La Huerta, C. P. 58190. Morelia, Michoacán, México. maresilva@live.com

<sup>7</sup> Laboratorio de Biología Acuática, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, C.P. 58000. Morelia, Michoacán, México. omar.dominguez@umich.mx

\*Corresponding authors:

M. en C. Ivette Marai Villa Villaseñor

E-mail address: 0620850k@umich.mx

Dra. Esperanza Meléndez Herrera

E-mail address: emelendez@umich.mx

## **ABSTRACT**

Goodeinae is a subfamily of severely threatened endemic fish that inhabit Central Mexico. The populations of *Skiffia lermae*, a member of this subfamily, have drastically decreased during the last 20 years. Previous work showed that *S. lermae* is sensitive to acute exposure to nitrates, presenting remarkable alterations in behavioral and histopathological bioindicators. In this study nitrate concentrations previously registered in habitats where *S. lermae* inhabit were evaluated to determine if the species is vulnerable to environmentally relevant nitrate concentrations. Survival, feeding behavior and aquatic surface respiration, body growth and condition index, immature red blood cells as well as branchial, hepatic and gonadal histopathology were evaluated in *S. lermae* offspring exposed to 5, 10 and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L. In addition, water quality in springs where *S. lermae* presently persists were analyzed to forecast their long-term maintenance in these habitats. The results showed decreased survival as nitrate concentration increased, as well as increased feeding latency, aquatic surface respiration, and histological damage in gills and liver. These organs showed differential sex-dependent responses to nitrate exposure; females were more sensitive than males. In ovaries, a decreased density of stage III oocytes was associated with increased nitrate concentrations. No changes were observed in growth and hematological parameters. Nitrate concentrations recorded at the three springs where *S. lermae* inhabit were below 2 mg/L. Together, the results could contribute explain why *S. lermae* disappeared from freshwater ecosystems more contaminated where nitrates levels above 5 mg/L. Future studies should determine the effect of nitrate concentrations above 2 mg/L on *S. lermae* physiology, with the aim of maintaining the springs where the species still survives.

**Keywords:** survival, feeding behavior, aquatic surface respiration, hematological indicators, branchial, hepatic and gonadal histopathology.

## INTRODUCTION

The Goodeinae subfamily comprises a group of endemic fish representative of Central Mexico, characterized by inner fertilization, sex dimorphism, complex courtship, and matrotrophy (Iida et al., 2019). The most Goodeinae species are in critical conservation status (IUCN, 2023). Although several anthropic impacts could explain their diminished distribution and survival, pollution is a critical factor that continues to threaten the maintenance of freshwater ecosystems (Lyons et al., 2019; Lyons et al., 2020).

Nitrogen is one of the more widespread pollutants in aquatic ecosystems (Galloway et al., 2004), which appears as ammonia ( $\text{NH}_3$ ) or ammonium ( $\text{NH}_4$ ). These reduced nitrogen compounds may be transformed into nitrite ( $\text{NO}_2$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3$ ) by oxidation (Camargo et al., 2006). Because  $\text{NO}_3$  shows high persistence and solubility, it is the most stable and common form of inorganic nitrogen in natural ecosystems (Baker et al., 2017). Elevated  $\text{NO}_3$  concentrations in freshwater ecosystems are toxic to aquatic organisms (McGurk et al., 2006; Edwards and Guillette, 2007; Gomez Isaza et al., 2018, 2021). Although the precise physiological mechanisms underlying these effects have not been widely described, the main consequence of  $\text{NO}_3$  exposure is a reduction of oxygen transport produced by methemoglobinemia and gill damage (Yang et al., 2019). The branchial tissue protects itself from  $\text{NO}_3$  by cell hyperplasia, hyperemia and lamellar fusion (Monsees et al., 2017; Villa-Villaseñor et al., 2022). These actions reduce the available surface for gas exchange, promoting behavioral and physiological compensatory mechanisms, such as aquatic surface respiration (ASR) and increased release of splenic red blood cells (Gomez Isaza et al., 2021). Chronic exposure to elevated  $\text{NO}_3$  concentrations leads to permanent gill damage, decreased body growth and endocrine disruption (McGurk et al., 2006; Hamlin et al., 2008; Kellock et al., 2018). Nitrate sensitivity is species-specific and could be related to body size (Hamlin, 2006; Villa-Villaseñor et al., 2022), feeding habits (Weis et al., 1999), reproductive strategy (Camargo et al., 2005), detoxifying abilities (Gomez Isaza et al., 2018; Villa-Villaseñor et al., 2022) and sex (Cano-Rocabayera et al., 2019). Moreover,  $\text{NO}_3$  sensitivity could be associated with the ontogenetic stage during which exposure

occurs (Hamlin, 2006; Adelman et al., 2009).

*Skiffia lermæ* is a member of the Goodeinae subfamily whose historical distribution in Zacapu, Yuriria, Pátzcuaro, Zirahuén and Cuitzeo lakes and the Middle Lerma river drainages has been limited to few springs in Zacapu, Pátzcuaro and Cuitzeo drainages (Lyons et al., 2019). Nowadays, this species is classified as threatened (NOM-059-SEMARNAT-2010) and endangered (IUCN, 2023). Previous work showed that *S. lermæ* is a sensitive species to  $\text{NO}_3$ . The median lethal concentration ( $\text{LC}_{50}$ ) was the lowest of the four goodeid species studied (Villa-Villaseñor et al., 2022) and one of the lowest reported so far for freshwater fish (Monson, 2022).

Nitrate-nitrogen ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) concentrations recorded in springs with low human impact were 0.015 mg/L (Allan and Castillo, 2007). Monitoring studies at Zacapu, Pátzcuaro, Yuriria and Cuitzeo lakes have reported 0.08-3.9 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ , whereas Lerma basin showed 2-30 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  (Unpublished results and Pérez-Díaz et al., 2019). In Mexico, the permissible limit for sewage discharges into freshwater is a daily average of 25 mg total N/L (NOM-001-SEMARNAT, 2021), and for human consumption 11 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  (NOM-127-SSA1, 2021). Both limits appear above previously reported  $\text{NO}_3\text{-N}$  concentrations in springs where *S. lermæ* can still be found. To determine if medium to high but ecologically relevant  $\text{NO}_3\text{-N}$  concentrations cause deleterious effects on *S. lermæ*, offspring of this species were chronically exposed to 5, 10 and 20 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  during 60 days. Their survival, feeding behavior, ASR, body growth, condition index and number of immature red blood cells, and branchial, hepatic and gonadal histology were evaluated. Additionally, because there are no recent reports in freshwater ecosystems where *S. lermæ* is currently distributed, this study analyzed  $\text{NO}_3\text{-N}$  concentrations on La Mintzita spring, Chapultepec spring and Zacapu lake.

The results of this study offer valuable insights into the possible causes of the reduction and disappearance of vulnerable and endemic species from freshwater habitats in Central Mexico with high  $\text{NO}_3\text{-N}$  contamination. Moreover, it sheds light on the physiological responses of this endangered species. These findings provide critical elements for environmental regulation of safer pollutant limits by considering the sensitivity of native species, ensuring their long-term survival.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Ethical statements**

Sampling and laboratory fish handling protocols were authorized by an Animal Rights Committee under License Number SEMARNAT: SPARN/DGVS/02210/22, under the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996).

### **Habitat characterization and collection of females**

During 2022 thirty gravid *S. lermae* females were captured from Zacapu Lake, Central Mexico (19.824193°N; -101.787312°W) with aluminum mesh minnow traps (Gee-minnow-traps® G-40, USA). Females were transported in bags containing water from the collection site and acclimated to the laboratory conditions according with Villa-Villaseñor et al. (2022).

In order to have an updated reference on water quality where *S. lermae* persists, Zacapu lake in the Angulo river sub-basin of the Lerma-Chapala basin, La Mintzita in the Rio Grande-Cuitzeo basin and Chapultepec spring in the Patzcuaro lake basin were evaluated in September 2023, near the end of the rainy season (Figure 1). The following water parameters were recorded using a multiparameter probe (OAK-TON®, Sydney, Australian): hydrogen potential (pH), dissolved oxygen ( $\text{mg/L}^{-1}$ ), dissolved oxygen saturation (percentage), and water temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ). Water samples were transported to the laboratory to evaluate the concentrations of ammonium-nitrogen ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ), nitrite-nitrogen ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ), and  $\text{NO}_3\text{-N}$ , following the methodologies described in the American Public Health Association (APHA, 2017).

### **Chronic toxicity assays**

Aquariums were supplied with tap water filtered by activated carbon, ultrafiltration membrane and ultraviolet light. During acclimatization, offspring were fed *ad libitum* with *Artemia* sp. and Tetra commercial flakes (Rueda-Jasso et al., 2017). Temperature, dissolved oxygen, pH, salinity, total dissolved solids, and electrical conductivity were recorded every 72 h with a multiparameter probe (YSI EXO2, Ohio, USA). Fifty percent of the aquarium's water was replaced every 72 h. A semi-static experimental system with a 12 h light/darkness photoperiod,  $22 \pm 0.5$   $^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 7 \pm 0.5$ , and  $7 \pm 0.5$   $\text{mg/L}$  dissolved oxygen was maintained throughout the entire experimental period.

Offspring from 1-7 postnatal days were assigned to experimental aquariums for acclimatization. Their body mass and length were recorded three weeks later with a precision analytical balance (OHAUS™ Adventurer d=0.0001 g, China) and a Vernier (Fisher Scientific™ S/N 1366162, EE USA). Then, 10 fish were randomly assigned per aquarium (15 L for aquarium; 1.5 L per fish). The NO<sub>3</sub>-N concentrations used in this study were obtained from concentrations recorded in Central Mexico (Trujillo-Cárdenas et al., 2010; Espinal-Carreón et al., 2013; Pérez-Díaz et al., 2019) and the median lethal concentration for *S. lermæ* (Villa-Villaseñor et al., 2022). They were: 5, 10 and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L and for the control group was used 2 mg NO<sub>3</sub>-N/L. Three replicates per experimental condition were used. The experiment began four weeks after fish birth and had a total duration of 60 days. Once NO<sub>3</sub>-N was added and dissolved, organism survival was determined every 24 h. The criterion to confirm mortality was the absence of a response to a mechanical stimulus. The organisms were fed daily with Tetra commercial flakes at 10 % of the biomass per experimental aquarium (Rueda-Jasso et al., 2017). Web camera recordings (Logitech C505 HD WEBCAM) evaluated the ASR and feeding behavior for 20 min at 9 am. The ASR was evaluated during the first 5 min of recording, counting the number of the organisms distributed 5 cm below the water surface (Gomez Isaza et al., 2021). Feeding behavior was evaluated by quantifying the latency to detect food, the number of feeding fish and food consumption (percentage of food consumed by organisms: total consumption, 100%; partial, 50%; and without consumption, 0%), according to Rosales-Pérez et al. (2022). At the end of the experiment, fish were euthanized using an overdose of benzocaine anesthetic (75 mg L<sup>-1</sup>. Rueda-Jasso et al., 2017). Body mass, as well as total and standard length were recorded. Absolute growth, absolute growth rate and Fulton's condition factor were evaluated according to the following equations:

- a) Absolut growth = final body mass (mg) - initial body mass (mg)
- b) Absolute growth rate = final body mass (mg) - initial body mass (mg) / time (days)
- c) Fulton's condition factor = final body mass (mg) / standard length (mm)<sup>3</sup> (Tejeda-Vera et al., 2007).

## **Hematological and histological analysis**

Six fish per replicate (three males and three females; except for the concentration of 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L, where only 6 males and 5 females survived) were randomly selected for hematological and histological analysis. A blood sample was taken from the base of the caudal fin to quantify the number of immature red blood cells (Torres-Bugarín et al., 2007). A total of 2000 cells per organism were quantified in a bright field microscope at 1000x magnification (Leica DM3000).

For histological analysis, fish were fixed in Bouin solution (Sigma) at 4 °C for 48 h and processed following Villa-Villaseñor et al. (2022). Briefly, fish were longitudinally sectioned at 5 µm and stained with hematoxylin and eosin (Cano-Rocabayera et al., 2019). For morphometric gill analysis, the thickness of primary lamellae, secondary lamella length and width, as well as the interlamellar distance were used to calculate the proportion of total epithelia available for gas exchange (PAGE<sub>Tot</sub>), as previously described by Maggioni et al. (2012). Lower PAGE<sub>Tot</sub> index values mean less available epithelium. To obtain liver damage tissue index (LDTI), nuclear density and area were quantified according to Villa-Villaseñor et al. (2022). Theoretically, values above from the reference (control group) indicate alterations related to proliferative and hypertrophic processes, whereas the values below the reference denote degenerative damage (Macirella et al., 2023).

Gonadal analyses were performed only in females. Oocyte morphology was used to determine the ovarian stage (Supplementary Table 1), according to Uribe-Aranzábal et al. (2006; 2012) and Tinguely et al. (2019). Because oocytes are large cells that occupy most of the ovary, total oocytes with cytoplasmic oil droplets (stage III, previtellogenic oocytes) were quantified in medial ovarian sections. The percentage of atresia was quantified using total stage III oocytes in the same section (Uribe-Aranzábal et al., 2006. Supplementary Table 2).

## **Data analyses**

The effects of NO<sub>3</sub>-N concentrations were evaluated on *S. lemae* survival, feeding behavior, ASR, body growth and Fulton's condition factor, number of immature red blood cells, gill PAGE<sub>TOT</sub> index, LDTI, oocytes density and the percentage of atresia. Data normality and equal variance were analyzed using Shapiro-Wilk and Levene

tests. Ecosystem freshwater and aquarium water quality parameters were compared using ANOVA or Kruskal-Wallis analyses followed by post-hoc tests according to the statistical assumptions. The survival rate was calculated by the Kaplan-Meier method followed by the log-rank test. Food consumption was analyzed by a Chi-square test. The rest of the response variables were analyzed by generalized linear mixed models, which included nitrate concentration as a fixed factor and aquarium id as a random factor (Cano-Rocabayera et al., 2019; Soler et al., 2021). To evaluate if the effects of NO<sub>3</sub>-N concentrations were different along the exposure period, behavior models also included time (divided in three periods of 20 days), as well as the interaction of nitrate concentration x time as fixed factors. Body growth and Fulton's condition factor, as well as hematological and histological models included sex and the interaction of nitrate concentration x sex as fixed factors. These last analyses were performed using five males and five females per experimental condition, because at 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L only five females survived. Generalized linear mixed models were performed using Poisson (the number of active fish and ASR), Gaussian (body growth and Fulton's condition factor), Gamma (LDTI and oocytes density) and Beta distributions (PAGE<sub>TOT</sub> and the percentage of atresia). The best model was chosen by Akaike's information criterion, analysis of deviance (D<sup>2</sup>) and visual inspection of residuals. Statistical significance was defined as  $p \leq 0.05$ . All results are shown as mean  $\pm$  standard error. Analyses were done with R core using the following packages: lme4 (Bates et al., 2015), DHARMA (Hartig, 2022), glmmTMB (Brooks et al., 2017), gamlss (Rigby and Stasinopoulos, 2005), ggplot2 (Wickham, 2016), survival (Therneau, 2022) and survminer (Kassambara et al., 2021).

## **RESULTS**

### **Freshwater ecosystem and aquarium water quality**

The water habitat of *S. lermæ* presented a tendency for alkalinity (pH = 7.81 $\pm$ 0.17), a mean temperature of 20.6 $\pm$ 0.38, and a mean dissolved oxygen of 6.11 $\pm$ 0.12. Significant differences were found in temperature, pH, dissolved oxygen, saturated dissolved oxygen, nitrate, and ammonium among each distribution site of *S. lermæ*. The nitrate concentration ( $X^2_{(2)} = 25.61$ ;  $p < 0.001$ ) and ammonium ( $X^2_{(2)} = 9.36$ ;

$p=0.009$ ) were significantly lower in Zacapu than on La Mintzita or Chapultepec (Table 1).

Aquarium water quality was similar for all experimental conditions except for those parameters linked to  $\text{NO}_3\text{-N}$  concentration such as salinity, conductivity, and total dissolved compounds (Supplementary Table 3).

### **Survival rate**

Survival diminished as  $\text{NO}_3\text{-N}$  concentrations and exposure time increased, but only 20 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  was different from control ( $X^2_{(3)} = 48.8$ ;  $p < 0.001$ ). At the end of the experiment, 80% and 36% of the population survived at 10 and 20 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ , respectively (Figure 2).

### **Feeding behavior and aquatic surface respiration (ASR)**

An effect of  $\text{NO}_3\text{-N}$  concentration and exposure period was observed on the latency of food consumption. At 5 and 10 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ , an increased latency for food detection was observed during the last period, while at 20 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ , an increment was observed from the first period. Latency for food detection was increases as exposure time increased (Figure 3A and Table 2). No effect was observed on the number of fish actively responded to food (Figure 3B and Table 2). The ASR increase as  $\text{NO}_3\text{-N}$  concentration and exposure time increase (Figure 4 and Table 2). Food consumption was decreased only at 20 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  compared to the control group ( $X^2_{(6)} = 20.395$ ;  $p = 0.002$ . Figure 5).

### **Body growth and Fulton's condition factor**

No differences in body growth (absolute growth, absolute and specific growth rates) or the Fulton's condition factor were observed at different  $\text{NO}_3\text{-N}$  concentrations, sex, or their interaction (Table 3).

### **Hematological analysis**

Nitrate-nitrogen exposure, sex, or interaction did not affect the number of immature erythrocytes (Table 3).

### **Histological analysis**

Exposure at 5, 10 and 20 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  diminished the gill  $\text{PAGE}_{\text{Tot}}$  index. An effect of sex was evident at 10 and 20 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ . Females showed a lower  $\text{PAGE}_{\text{Tot}}$  index than males (Figure 6 and Table 4).

The LDTI also showed a differential effect from the control group at the different NO<sub>3</sub>-N concentrations. At 5 and 10 mg NO<sub>3</sub>-N/L, the LDTI was increased, while at 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L, this indicator diminished. An effect of sex was observed only at 5 mg NO<sub>3</sub>-N/L; females showed the highest values (Figure 7 and Table 4).

Females from all experimental groups were at the same previtellogenic gonadal stage III. Nitrate-nitrogen at 10 and 20 mg/L caused a decrease in the density of stage III oocytes compared to the control group. No differences were observed in the percentage of atresia (Figure 8 and Table 4).

## **DISCUSSION**

*Skiffia lermæ* is severely threatened, it is listed as endangered by the IUCN (2023). Its distribution has been reduced in more than 60% of the historical records of the species and healthy populations are found in a few springs in Central Mexico (Domínguez-Domínguez et al., 2008; Lyons et al., 2019). Previous research has shown that *S. lermæ* is highly sensitive to NO<sub>3</sub>-N (Villa-Villaseñor et al., 2022). High nitrate concentrations appear as a threshold that could threaten the species' survival. To test this theory, we conducted a study to evaluate the impact of exposure to environmentally relevant NO<sub>3</sub>-N concentrations on the physiological parameters of the fish. Our results indicate that exposure to these concentrations can alter behavior, increase gill and liver histopathological indicators, reduce the density of germinal cells in the ovary, and decrease fish survival. We also found that females are more sensitive to NO<sub>3</sub>-N than males. Our study is the first to assess the effects of environmentally relevant NO<sub>3</sub>-N concentrations on a wild species population. These findings emphasize the importance of revisiting the limits of NO<sub>3</sub>-N concentrations in freshwater ecosystems to ensure the survival of endemic wild fish populations.

### **Nitrate concentrations in freshwater ecosystems continue to increase and could endanger *Skiffia lermæ* populations**

Historical data is lacking regarding NO<sub>3</sub>-N concentrations in ecosystems where *S. lermæ* populations were distributed. The most recent records place *S. lermæ* individuals at Zacapu lake, La Mintzita and Chapultepec springs (Lyons et al., 2019). Here, water quality analysis of these sites showed that Zacapu lake presents lower

NO<sub>3</sub>-N concentrations, as well as higher oxygen concentrations. Low nitrogenous compounds indicate better water quality for native fish abundance and survival (Mar-Silva et al., 2021). The fact that La Mintzita spring shows higher concentrations of NO<sub>3</sub>-N compared to its historical records could reflect the early impact of urbanization. This idea is supported by recent reports showing that La Mintzita spring is influenced by the increase in human population, with a density of 712 inhabitants per km<sup>2</sup> (INEGI, 2021). This deterioration caused a population decline and local extinctions of fish fauna in the Cuitzeo basins to which Mintzita spring belongs (Soto-Galera et al., 1999; Lyons et al., 2019). Therefore, if the impacts of anthropization continue, there is a severe risk of increasing the NO<sub>3</sub>-N concentrations to an intolerable level for *S. lermae*. Monitoring programs at these sites are necessary to guarantee the survival of endemic populations.

#### **Chronic exposure to ecologically relevant NO<sub>3</sub>-N concentrations diminished *Skiffia lermae* survival**

Offspring were exposed to NO<sub>3</sub>-N concentrations close to those described in areas where *S. lermae* was historically reported (Lyons et al., 2019; Pérez-Díaz et al., 2019); as well as according to a previous study (Villa-Villaseñor et al., 2022). At the highest NO<sub>3</sub>-N concentration, *S. lermae* survival decreased during the first 20 days of exposure, only 36% of fish remained at the end of the experiment (60 days), whereas at the medium concentration 80% of fish survived. Considering that the permissible limit for sewage discharges into freshwater is 25 mg total N/L (NOM-001-SEMARNAT, 2021) and 11 mg NO<sub>3</sub>-N/L for human consumption (NOM-127-SSA1, 2021), our results suggest that these parameters are above the critical threshold for sensitive fish species and endanger their long term survival.

#### **The lowest NO<sub>3</sub>-N concentration caused alterations in *Skiffia lermae* feeding behavior without modifying their body growth**

The results showed that more prolonged exposure to all NO<sub>3</sub>-N concentrations increased the latency of feeding behavior, whereas at the highest concentration the alteration was observed from the first period. Exposure to 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L also diminished the amount of ingested food. No change was observed in the number of actively responsive fish. The observed differences between the first concerning the

second and third periods in latency and actively responsive fish could be explained by the acclimatization to new social interactions, and the diminished survival during the first period. Previous studies showing that fish respond to new environments, mates and population density support this observation (Crane et al., 2018).

Fish feeding behavior is determined mainly by visual and chemical signals, and depends on a functional motor system (Hara, 2006; Morais et al., 2017). No differences were observed in the food consumed between control and fish exposed to 5 and 10 mg NO<sub>3</sub>-N/L. Nevertheless, it is important to note that alterations in feeding behavior at these concentrations were evident until the final exposure period. In the case of *S. lermæ* individuals exposed to 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L, diminished food consumption could be related to fatigue and low oxygen consumption due to the decreased epithelium available for gas exchange (see below), as was previously suggested (Cano-Rocabayera et al., 2019).

#### ***Skiffia lermæ* increased their aquatic surface respiration and gill histomorphometric alterations at the lowest NO<sub>3</sub>-N concentrations**

The ASR is an early indicator of low oxygen consumption caused by diminished hemoglobin or branchial damage (Gomez Isaza et al., 2021). Hemoglobin is a blood protein that transports oxygen from the gills to the rest of the body. Toxic NO<sub>3</sub>-N concentrations cause the conversion of hemoglobin to methemoglobin, a protein unable to transport oxygen efficiently (Camargo et al., 2006; Yang et al., 2019; Presa et al., 2022). The initial mechanisms to increase oxygen exchange include splenic erythrocyte release and their accumulation in gills (hyperemia), which increases the proportion of immature erythrocytes circulating in the blood. Persistent toxic concentrations produce sequential gill compensatory and degenerative mechanisms, such as hyperplasia and lamellar fusion, respectively (Antunes et al., 2017). Herein, no changes were observed in immature red blood cell count between control and NO<sub>3</sub>-N exposed groups at the end of the experiment. However, the gill histomorphometric index showed a diminished PAGE<sub>Tot</sub> (the proportion of total epithelial available for gas exchange) from the lowest nitrate concentration. These results suggest that even the minimal NO<sub>3</sub>-N concentration was high enough to trigger structural compensatory and degenerative branchial alterations. As

previously shown, blood-associated compensatory mechanisms could occur during early NO<sub>3</sub>-N exposure (Gomes Isaza et al., 2020; Presa et al., 2022). At the highest NO<sub>3</sub>-N concentration, females showed a more remarkable reduction in PAGE<sub>Tot</sub> than males, which suggests that females are more susceptible to nitrates than males.

#### **Skiffia lermæ showed progressive liver histomorphometric alterations as NO<sub>3</sub>-N concentrations increased**

The LDTI (which includes quantifying of hepatocyte nuclear area and density) was increased from the lowest two NO<sub>3</sub>-N concentrations, but decreased at the highest concentration. An increased LDTI reflects cell proliferation and nuclear hepatocyte hypertrophy, early compensatory mechanisms that increase metabolic and transcriptional activity oriented to increase detoxification processes (Bangru and Kalsotra, 2020). A decreased LDTI denotes degenerative changes associated with reduced hepatocyte activity and death (Villa-Villaseñor et al., 2022). The results suggest that the lowest concentration induces liver changes, which could be reversible if environmental conditions are better while the highest concentration could produce irreversible changes. Again, *S. lermæ* females showed an increased hepatocyte nuclei area and density at the lowest concentration. Because *S. lermæ* is a viviparous species, reproduction is high energy demanding. Thus, the trade-off to preserve reproductive function may allow liver damage. Previous studies suggest that sex-associated differences in liver alterations could be related to the differential absorption, distribution, metabolism, and excretion of toxic substances (Flores et al., 2017).

#### **Environmental relevant NO<sub>3</sub>-N concentrations diminished reproductive indicators in *Skiffia lermæ* females**

*Skiffia lermæ* is a viviparous species in which fertilization and embryonic development occur in the ovary (Iida et al., 2019) and sexual maturity is reached approximately at 29.5 ± 5.7 mm of body length (Ramírez-García et al., 2021). Females in each reproductive period have between six and 23 offspring, which is the lowest fertility value compared with other goodeines species that are distributed in Lake Zacapu (Ramírez-García et al., 2021). Here, *S. lermæ* females showed an average of 21.73 ± 0.28 mm in body length, which suggests that they are sexually

immature and supports the absence of vitellogenic oocytes.

Atresia is a physiological process where the degeneration and reabsorption of oocytes are observed, which makes it possible to recover part of the energy and components invested during follicular maturation (Uribe-Aranzábal et al., 2006). Atresia mainly affects follicles that contain oocytes with yolk (Corriero et al., 2021). However, its appearance has been reported in atretic follicles without yolk in fish, affecting previtellogenic oocytes at a stage where the cortical lipid alveoli are observed (Corriero et al., 2021). A progressive decrease in stage III oocytes was observed at the highest NO<sub>3</sub>-N concentration, and no changes in atretic oocytes. Because stage III oocytes will mature to become fertilized and develop an embryo, the decreased number of oocytes in the ovary will reduce the female's fertility index, which could contribute to diminished *S. lermae* populations in the long term.

## **CONCLUSION**

Together, the results of this study show that exposure to relevant freshwater NO<sub>3</sub>-N concentrations promoted compensatory and degenerative changes in *S. lermae* that could contribute to explaining their disappearance in anthropized ecosystems. The results indicate that exposure to concentrations above 5 mg NO<sub>3</sub>-N/L could decrease the fitness of organisms with a similar sensitivity to *S. lermae*. The number of offspring can be a factor that contributes to species vulnerability, as is the case of *S. lermae*. We recommend further testing with a longer exposure time and assessing more reproductive biomarkers, such as circulating and gonadal levels of reproductive hormones. In general, our results suggest a reassessing of the guidelines that establish the permissible limits of pollutants in wastewater discharges into receiving freshwaters.

## **REFERENCES**

Adelman, I., Kusilek, L., Koehle, J., and Hess, J., 2009. Acute and chronic toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the endangered topeka shiner (*Notropis topeka*) and fathead minnows (*Pimephales promelas*). Environ. Toxicol. Chem. 28, 2216-2223. doi: 10.1897/08-619.1.

Allan, J., and Castillo, M., 2007. Stream ecology. The structure and function of running waters. Dordrecht, Netherlands: Springer.

American Public Health Association [APHA], 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd Edn. Washington, DC: APHA.

Antunes, A., Rocha, T., Pires, F., de Freitas, M., Leite, V., Arana, S., et al., 2017. Gender-specific histopathological response in guppies *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate or its metabolite aminomethylphosphonic acid. *J. Appl. Toxicol.* 37, 1098-1107. doi: 10.1002/jat.3461.

Bangru, S., and Kalsotra, A., 2020. Cellular and molecular basis of liver regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 100, 74-87. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.12.004.

Baker, J., Gillon, G., Chalmers, B., and Elphick, J., 2017. Evaluation of the effect of water type on the toxicity of nitrate to aquatic organisms. *Chemosphere.* 168, 435-440.

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., and Walker, S., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software.* 67(1), 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01.

Brooks, M., Kristensen, K., van Benthem, K., Magnusson, A., Berg, C., Nielsen, A., Skaug, H., Maechler, M., and Bolker, B., 2017. glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *The R Journal.* 9(2), 378-400. doi: 10.32614/RJ-2017-066.

Camargo, J., and Alonso, A., 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ. Int.* 32, 831–849. doi: 10.1016/j.envint.2006.05.002.

Camargo, J., Alonso, A., and Salamanca, A., 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: A review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere.* 58, 1255–1267. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.10.044.

Cano-Rocabayera, O., Sostoa, A., Padrós, F., Cárdenas, L., and Maceda-Veiga, A., 2019. Ecologically relevant biomarkers reveal that chronic effects of nitrate depend on sex and life stage in the invasive fish *Gambusia holbrooki*. *PLoS One.* 14, e0211389. doi: 10.1371/journal.pone.0211389.

Corriero, A., Zupa, R., Mylonas, C. and Passantino, L., 2021. Atresia of ovarian follicles in fishes, and implications and uses in aquaculture and fisheries. *J Fish Dis.* 44 (9), 1271-1291. doi: 10.1111/jfd.13469.

Crane, A., Bairos-Novak, K., Sacco, L., and Ferrari, M., 2018. The socially mediated recovery of a fearful fish paired with periodically replaced calm models. *Proc Biol Sci.* 3 (285), 20180739. doi: 10.1098/rspb.2018.0739.

Domínguez-Domínguez, O., Zambrano, L., Escalera-Vázquez, L., Pérez-Rodríguez, R., and Pérez-Ponce de León, G., 2008. Cambio en la distribución de Goodeidos (Osteichthyes: Cyprinodontiformes: Goodeidae) en cuencas hidrológicas del centro de México. *Rev. Mex. Biodivers.* 79, 501-512.

Edwards, T., and Guillette, L., 2007. Reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from nitrate-contaminated springs in Florida. *Aquatic Toxicology.* 85, 40-47.

Espinal-Carreón, T., Sedeño-Díaz, J., and López-López, E., 2013. Evaluación de la calidad del agua en la Laguna de Yuriria, Guanajuato, México, mediante técnicas multivariadas: un análisis de valoración para dos épocas 2005, 2009-2010. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29 (3),147-163.

Flores, K., Manautou, J., and Renfro, J., 2017. Gender-specific expression of ATP-binding cassette (Abc) transporters and cytoprotective genes in mouse choroid plexus. *Toxicology.* 386, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.05.019>.

Galloway, J., Denterner, F., Capone, D., Boyer, E., Haowarth, R., Seitzinger, S., et al., 2004. Nitrogen cycles: Past, present, and future. *Biogeochemistry.* 70, 153-226. doi: 10.1007/s10533-004-0370-0.

Gomez Isaza, D., Cramp, R., and Franklin, C., 2018. Negative impacts of elevated nitrate on physiological performance are not exacerbated by low pH. *Aquat. Toxicol.* 200, 217-225. doi: 10.1016/j.aquatox.2018.05.004.

Gomez-Isaza, D., Cramp, R., and Franklin, C., 2020. Living in polluted waters: A meta-analysis of the effects of nitrate and interactions with other environmental

stressors on freshwater taxa. *Environl Pol.* 261, 1–12. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114091.

Gomez Isaza, D., Cramp, R., and Franklin, C., 2021. Exposure to Nitrate Increases Susceptibility to Hypoxia in Fish. *Physiol. Biochem. Zool.* 94, 124-142. doi: 10.1086/713252.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996. National research council of the National Academies, 8th Edn. (Washington, DC: The National Academies Press), 246.

Hamlin, H., Moore, B., Edwards, T., Larkin, I., Boggs, A., High, W., Main, K. and Guillette. L., 2008. Nitrate induced elevations in circulating sex steroid concentrations in female Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) in commercial aquaculture. *Aquaculture.* 281, 118-125.

Hamlin, H. (2006). Nitrate toxicity in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Aquaculture.* 253, 688-693. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.08.025.

Hara, T., 2006. Feeding behaviour in some teleosts is triggered by single amino acids primarily through olfaction. *Journal of Fish Biology.* 68 (3), 810-825. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2006.00967.x>.

Hartig, F., 2022. DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models. R package version 0.4.6. <https://CRAN.R-project.org/package=DHARMA>.

Iida, A., Arai, H., Someya, Y., Inokuchi, M., Onuma, T., Yokoi, H., et al., 2019. Mother-to-embryo vitellogenin transport in a viviparous teleost *Xenotoca eiseni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 22359-22365. doi: 10.1073/pnas.1913012116.

INEGI, 2021. Red hidrografica digital de México escala 1:250 000 edición 1.0.

IUCN, 2023. The IUCN red list of threatened species. Version 2022-2. Available online at: <https://www.iucnredlist.org> (accessed july 10, 2023).

Kassambara, A., Kosinski, M., and Biecek, P., 2021. survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. R package version 0.4.9. <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>.

Kellock, K., Moore, A., and Bringolf, R., 2018. Chronic nitrate exposure alters reproductive physiology in *fathead minnows*. *Environmental Pollution*. 232, 322-328.

Lyons, J., Piller, K., Artigas-Azas, J., Dominguez-Dominguez, O., Gesundheit, P., Köck, et al., 2019. Distribution and current conservation status of the Mexican Goodeidae (Actinopterygii, Cyprinodontiformes). *ZooKeys*. 885, 115–158. doi: 10.3897/zookeys.885.38152.

Lyons, T., Máiz-Tomé, L., Tognelli, M., Daniels, A., Meredith, C., Bullock, R., and Harrison, L. (eds.), 2020. The status and distribution of freshwater fishes in Mexico. UK and Albuquerque, New Mexico, USA: IUCN and ABQ BioPark.

Maggioni, T., Hued, A., Monferrán, M., Bonansea, R., Galanti, L., and Amé, M., 2012. Bioindicators and biomarkers of environmental pollution in the middle-lower basin of the Suquía River (Córdoba, Argentina). *Archives of environmental contamination and toxicology*. 63 (3), 337-353.

Macirella, R., Curcio, V., Ahmed, AIM., Talarico, F., Sesti, S., Paravani, E., Odetti, L., Mezzasalma, M., and Brunelli, E., 2023. Morphological and Functional Alterations in Zebrafish (*Danio rerio*) Liver after Exposure to Two Ecologically Relevant Concentrations of Lead. *Fishes*. 8 (7), 342. <https://doi.org/10.3390/fishes8070342>.

Mar-Silva, V., Herrerías-Diego, Y., Medina-Nava, M., Ramírez-Herrejón, J. P., Mendoza-Cuenca, L., Hernández-Morales, R., and Domínguez-Domínguez, O., 2021. Spatial and temporal variation of fish assemblage structure in a neotropical Mexican river. *Revista mexicana de biodiversidad*. 92.

McGurk, M., Landry, F., Tang, A., and Hanks, C., 2006. Acute and chronic toxicity of nitrate to early life stages of lake trout (*Salvelinus namaycush*) and lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2187–2196. doi: 10.1897/05-270r.1.

Monsees, H., Klatt, L., Kloas, W., and Wuertz, S., 2017. Chronic exposure to nitrate significantly reduces growth and affects the health status of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in recirculating aquaculture systems. *Aquac. Res.* 48, 3482–3492. doi: 10.1111/are.13174.

Monson, P., 2022. Aquatic Life Water Quality Standards Draft Technical Support Document for Nitrate. Minnesota Pollution Control Agency.

Morais, S., 2017. The Physiology of Taste in Fish: Potential Implications for Feeding Stimulation and Gut Chemical Sensing. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture.* 25 (2), 133-149. doi: 10.1080/23308249.2016.1249279

NOM-059-ECOL-2010 (Norma Oficial Mexicana), 2010. Protección Ambiental de Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestres- Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio de Lista de Especies en Riesgo. *Diario Oficial de la Federación.* México, D. F. Diciembre 2010 (accessed 10 March 2022).

NOM-001-ECOL-2021 (Norma Oficial Mexicana), 2021. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. México: *Diario Oficial de la Federación.* <http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/noticias> (accessed 25 July 2023).

NOM-127-SSA1-2021 (Norma Oficial Mexicana), 2021. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua: *Diario Oficial de la Federación.* [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5650705&fecha=02/05/2022#gs.c.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5650705&fecha=02/05/2022#gs.c.tab=0) (accessed 25 July 2023).

Pérez-Díaz, J., Ortega-Escobar, H., Ramírez-Ayala, C., Flores-Magdaleno, H., Sánchez-Bernal, E., Can-Chulim, A., and Mancilla-Villa, O., 2019. Concentration of nitrate, phosphate, boron and chloride in the Lerma River. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios.* 6 (16), 175-182.

Presa, L., Neves, G., Maltez, L., Sampaio, L., Monserrat, J., Copatti, C., et al., 2022. Acute and sub-lethal effects of nitrate on haematological and oxidative stress parameters of juvenile mullet (*Mugil liza*) in freshwater. *Aquac. Res.* 53, 3346–3357.

doi: 10.1111/are.15842.

Ramírez-García, A., Moncayo-Estrada, R., González-Cárdenas, J. J., and Domínguez-Domínguez, O., 2021. Reproductive cycle of native viviparous fish species (Actinopterygii: Cyprinodontiformes: Goodeidae) in a subtropical Mexican lake. *Neotrop. Ichthyol.* 19, 1–20. doi: 10.1590/1982-0224-2021-0105.

Rigby, R., and Stasinopoulos, D., 2005. Generalized additive models for location, scale and shape, (with discussion), *Appl. Statist.* 54, part 3, pp 507-554.

Rosales-Pérez, K., Elizalde-Velázquez, G., Gómez-Oliván, L., Orozco-Hernández, J., Cardoso-Vera, J., Heredia-García, G., Islas-Flores, H., García-Medina, S. and Galar-Martínez, M., 2022. Brain damage induced by contaminants released in a hospital from Mexico: Evaluation of swimming behavior, oxidative stress, and acetylcholinesterase in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere.* 294, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133791>.

Rueda-Jasso, R., De los Santos-Bailón, A., and Campos-Mendoza, A., 2017. Nitrite toxicity in juvenile Goodeinae fishes *Skiffia multipunctata* (Pellegrin, 1901) and *Goodea atripinnis* (Jordan, 1880). *J. Appl. Ichthyol.* 33, 300–305. doi: 10.1111/jai.13292.

Soler, P., Faria, M., Barata, C., García-Galea, E., Lorente, B., Vinyoles, D., 2021. Improving water quality does not guarantee fish health: Effects of ammonia pollution on the behaviour of wild-caught pre-exposed fish. *PLoS ONE*, 16(8), e0243404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243404>.

Soto-Galera, E., Paulo-Maya, J., López-López, E., Serna-Hernández, J. A., and Lyons, J., 1999. Change in fish fauna as indication of aquatic ecosystem condition in Río Grande de Morelia–Lago de Cuitzeo basin, Mexico. *Environmental Management.* 24, 133-140.

Tejeda-Vera, R., López-López, E., and Sedeño-Díaz, J., 2007. Biomarkers and bioindicators of the health condition of *Ameca splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameca River, Mexico. *Environmental International.* 33, 521-531.

Therneau, T., 2022. A Package for Survival Analysis in R. R package version 3.3-1, <URL: <https://CRAN.R-project.org/package=survival>>.

Tinguely, S., Lange, A., and Tyler, C., 2019. Ontogeny and Dynamics of the Gonadal Development, Embryogenesis, and Gestation in *Xenotoca eiseni* (Cyprinodontiformes, Goodeidae). *Sexual Development*. 13 (5-6), 297-310.

Torres-Bugarín, O., Zavala-Aguirre, J., Gómez-Rubio, P., Buelna-Osbe, H., Zúñiga-González G., and García-Ulloa Gómez, M., 2007. Especies de peces con potencial como bioindicadoras de genotoxicidad en el lago “La Alberca”, Michoacán, México. *Hidrobiológica*. 17 (1), 75-81.

Trujillo-Cárdenas, J., Nereida, P., Saucedo-Torres, P., Zárate del Valle, F., Ríos-Donato, N., Mendizábal, E. and Gómez-Salazar, S., 2010. Speciation and Sources of Toxic Metals in Sediments of Lake Chapala, Mexico. *J. Mex. Chem. Soc.* 5 4(2), 79-87.

Uribe-Aranzábal, M., De la Rosa-Cruz, G., García-Alarcón, A., Guerrero-Estévez, S., and Aguilar-Morales, M., 2006. Histological features of atretic stages of the ovarian follicles of two viviparous teleost species: *Ilyodon whitei* (Meek, 1904) and *Goodea atripinnis* (Jordan, 1880) (Goodeidae). *Hidrobiológica*. 16, 67-73.

Uribe-Aranzábal, M., Grier, H., and Parenti L., 2012. Ovarian structure and oogenesis of the oviparous goodeids *Crenichthys baileyi* (Gilbert, 1893) and *Empetrichthys latos* Miller, 1948 (Teleostei, Cyprinodontiformes). *Journal of Morphology*. 273, 371-387.

Villa-Villaseñor, I., Yáñez-Rivera, B., Rueda-Jasso, R., Herrera-Vargas, A., Hernández-Morales, R., Meléndez-Herrera, E. and Domínguez-Domínguez, O., 2022. Differential sensitivity of offspring from four species of goodeine freshwater fish to acute exposure to nitrates. *Front. Ecol. Evol.* 1-14.

Yang, X., Song, X., Peng, L., Hallerman, E., and Huang, Z., 2019. Effects of nitrate on aquaculture production, blood and histological markers and liver transcriptome of *Oplegnathus punctatus*. *Aquaculture*. 501, 387-396. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.11.048.

Weis, J., Smith, G., and Zhou, T., 1999. Altered predator/prey behavior in polluted environments: implications for fish conservation. *Environmental Biology of Fishes*. 55, 43–51. <https://doi.org/10.1023/A:1007496528012>.

Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.

**Table 1. Water quality (mean  $\pm$  standard error) measured in the freshwater ecosystems where *Skiffia lermae* populations persist nowadays (Lyons et al., 2019).**

	<b>Mintzita</b>	<b>Chapultepec</b>	<b>Zacapu</b>
pH	7.79 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>	6.94 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	8.99 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
Temperature (°C)	20.22 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>	19.13 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	22.93 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>
Dissolved oxygen (mg/L)	6.26 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	5.74 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	6.45 $\pm$ 0.35 <sup>ab</sup>
Dissolved oxygen saturation (percentage)	69.02 $\pm$ 1.44 <sup>a</sup>	62.36 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	75.82 $\pm$ 3.71 <sup>a</sup>
NO <sub>3</sub> -N (mg/L)	1.73 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.19 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	0.002 <sup>a</sup>	0.002 <sup>a</sup>	0.002 <sup>a</sup>
NH <sub>4</sub> -N (mg/L)	0.004 $\pm$ 0.001 <sup>ab</sup>	0.004 $\pm$ 0.00003 <sup>a</sup>	0.003 $\pm$ 0.0001 <sup>b</sup>

Different letters indicate significant differences between treatments.

**Table 2. Summary of the best generalized linear mixed models explaining latency for food detection, number of fish actively responsive to food and aquatic surface respiration in *Skiffia lermae*.**

<b>Response variable</b>	<b>Explanatory variables</b>	<b>Estimate (Standard error)</b>	<b>t value</b>	<b>Pr(&gt; z )</b>	
<b>Latency for food detection</b>	Intercept	2.647 (0.139)	18.945	<b>&lt;0.001</b>	
	Concentration 5 mg/L	0.081 (0.141)	0.576	0.564	
	Concentration 10 mg/L	-0.048 (0.141)	-0.346	0.729	
	Concentration 20 mg/L	0.287 (0.141)	2.038	<b>0.041</b>	
	Second period	-1.699 (0.133)	-12.717	<b>&lt;0.001</b>	
	Third period	-2.120 (0.133)	-15.872	<b>&lt;0.001</b>	
	Concentration 5 mg/L: Second period	-0.267 (0.189)	-1.416	0.156	
	Concentration 10 mg/L: Second period	0.131 (0.189)	0.697	0.485	
	Concentration 20 mg/L: Second period	0.630 (0.189)	3.321	<b>&lt;0.001</b>	
	Concentration 5 mg/L: Third period	0.387 (0.189)	2.042	<b>0.041</b>	
	Concentration 10 mg/L: Third period	0.390 (0.189)	2.065	<b>0.038</b>	
	Concentration 20 mg/L: Third period	0.377 (0.189)	1.997	<b>0.045</b>	
	<b>Number of fish actively responsive to food</b>	Intercept	2.061 (0.034)	59.144	<b>&lt;0.001</b>
		Concentration 5 mg/L	0.019 (0.036)	0.530	0.596
		Concentration 10 mg/L	-0.007 (0.036)	-0.202	0.840
Concentration 20 mg/L		-0.033 (0.037)	-0.907	0.365	
Second period		0.223 (0.034)	6.570	<b>&lt;0.001</b>	
Third period		0.243 (0.033)	7.171	<b>&lt;0.001</b>	

<b>Aquatic surface respiration</b>	Intercept	0.192 (0.136)	1.415	<b>0.007</b>
	Concentration 5 mg/L	0.161 (0.076)	2.124	<b>0.033</b>
	Concentration 10 mg/L	0.238 (0.074)	3.190	<b>0.001</b>
	Concentration 20 mg/L	0.255 (0.074)	3.432	<b>0.001</b>
	Second period	0.439 (0.075)	5.805	<b>&lt;0.001</b>
	Third period	0.785 (0.071)	10.934	<b>&lt;0.001</b>

Bold values denote significant effects at  $p \leq 0.05$ .

**Table 3. Summary of the best generalized linear mixed models explaining absolute growth, absolute growth rate, specific growth rate, Fulton's condition factor and immature red blood cells in *Skiffia lermae*.**

Response variable	Explanatory variables	Estimate (Standard error)	t value	Pr(> z )
<b>Absolute growth</b>	Intercept	0.188 (0.057)	11.984	<b>&lt;0.001</b>
	Concentration 5 mg/L	-0.002 (0.019)	-0.124	0.901
	Concentration 10 mg/L	0.006 (0.019)	0.340	0.734
	Concentration 20 mg/L	0.009 (0.019)	0.503	0.615
	SexMale	0.014 (0.014)	1.034	0.301
<b>Absolute growth rate</b>	Intercept	0.003 (0.0002)	12.664	<b>&lt;0.001</b>
	Concentration 5 mg/L	-0.0000 (0.0003)	-0.127	0.899
	Concentration 10 mg/L	0.0001 (0.0003)	0.350	0.726
	Concentration 20 mg/L	0.0001 (0.0003)	0.518	0.605
	SexMale	0.0002 (0.0002)	1.051	0.293
<b>Specific growth rate</b>	Intercept	-3.413 (0.065)	-52.31	<b>&lt;0.001</b>
	Concentration 5 mg/L	0.082 (0.081)	1.01	0.311
	Concentration 10 mg/L	0.137 (0.080)	1.71	0.088
	Concentration 20 mg/L	0.049 (0.081)	0.61	0.543
	SexMale	0.043 (0.056)	0.76	0.448

<b>Fulton's condition factor</b>	Intercept	-6.158 (0.027)	-220.52	<b>&lt;0.001</b>
	Concentration 5 mg/L	-0.041 (0.035)	-1.18	0.239
	Concentration 10 mg/L	0.020 (0.034)	0.59	0.557
	Concentration 20 mg/L	0.026 (0.034)	0.75	0.454
	SexMale	0.038 (0.024)	1.54	0.123
<b>Immature red blood cells</b>	Intercept	64.900 (9.075)	7.152	<b>&lt;0.001</b>
	Concentration 5 mg/L	-0.100 (11.480)	-0.009	0.993
	Concentration 10 mg/L	4.800 (11.482)	0.418	0.676
	Concentration 20 mg/L	5.700 (11.481)	0.496	0.620
	SexMale	10.800 (8.115)	1.331	0.183

Bold values denote significant effects at  $p \leq 0.05$ .

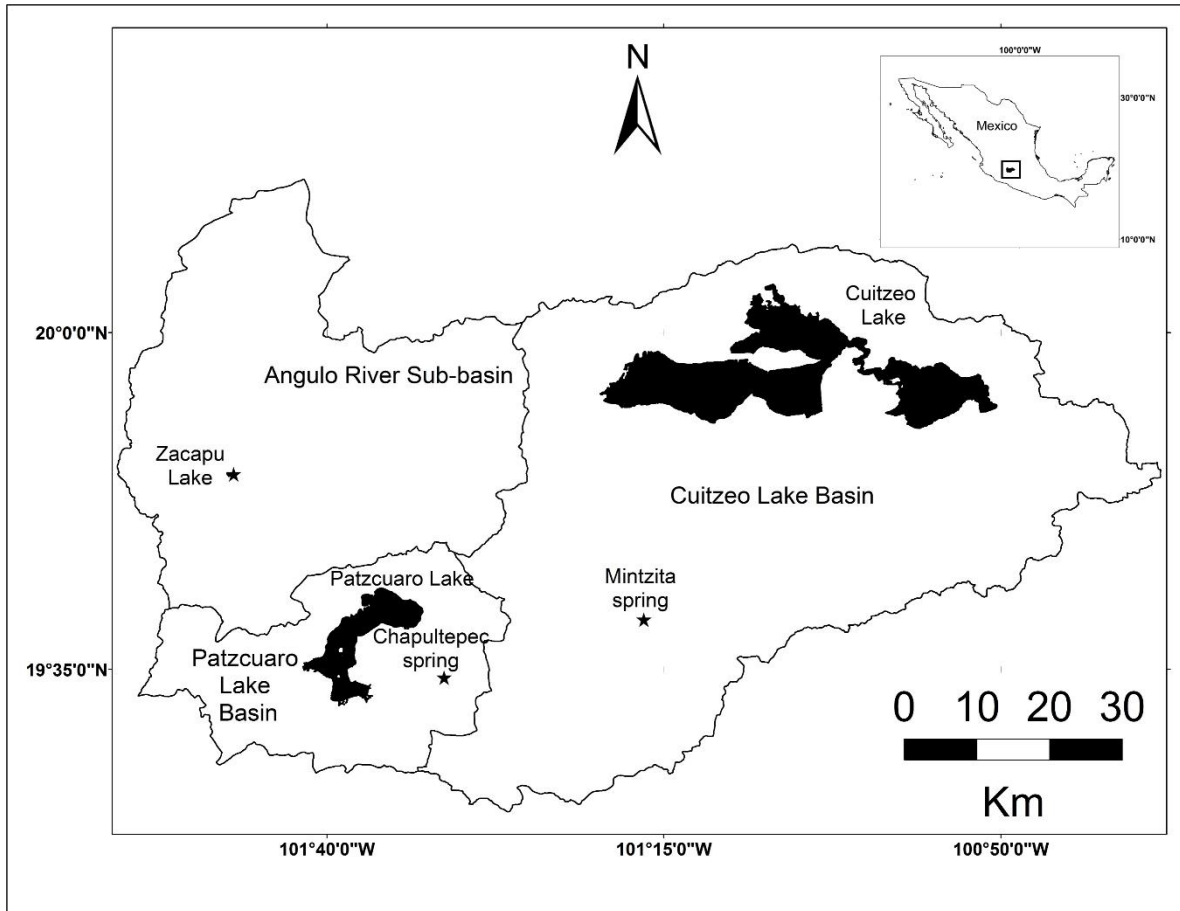
**Table 4. Summary of the best generalized linear mixed models explaining the proportion of total epithelia available for gas exchange ( $PAGE_{Tot}$ ) index, liver damage tissue index (LDTI), density of stage III oocytes and percentage of atresia in *Skiffia lermae*.**

Response variable	Explanatory variables	Estimate (Standard Error)	t value	Pr(> z )
<b><math>PAGE_{Tot}</math> index</b>	Intercept	-1.484 (0.044)	-33.02	<b>&lt;0.001</b>
	Concentration 5 mg/L	-0.196 (0.045)	-4.35	<b>&lt;0.001</b>
	Concentration 10 mg/L	-0.499 (0.047)	-10.58	<b>&lt;0.001</b>
	Concentration 20 mg/L	-0.757 (0.050)	-15.02	<b>&lt;0.001</b>
	SexMale	0.144 (0.042)	3.39	<b>&lt;0.001</b>
	Concentration 5 mg/L: SexMale	-0.017 (0.062)	-0.28	0.776
	Concentration 10 mg/L: SexMale	-0.166 (0.066)	-2.50	<b>0.012</b>
	Concentration 20 mg/L: SexMale	0.346 (0.067)	5.15	<b>&lt;0.001</b>

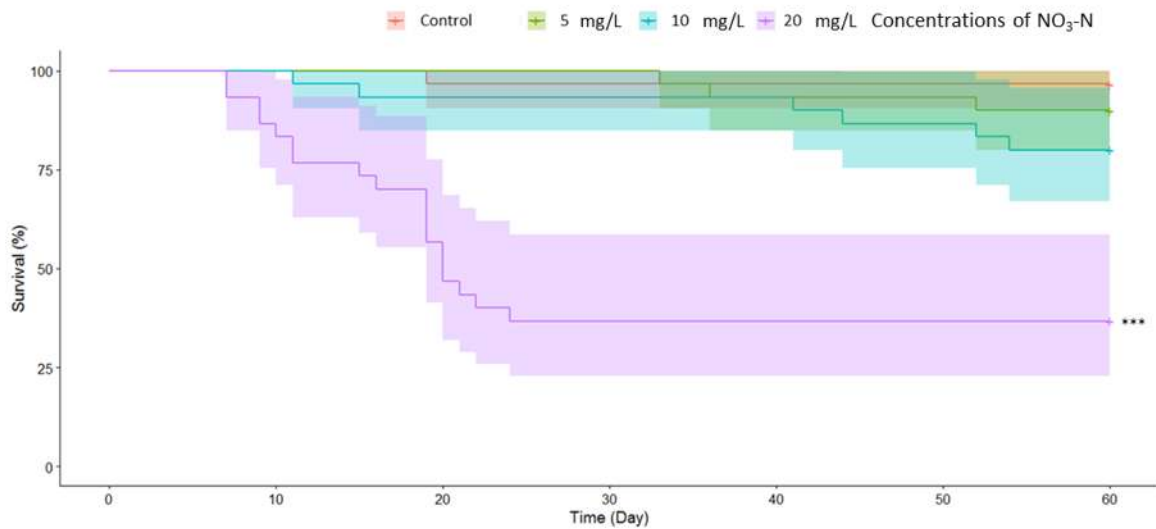
<b>LDTI</b>	Intercept	0.897 (0.047)	18.825	<b>&lt;0.001</b>
	Concentration 5 mg/L	-0.150 (0.012)	-12.261	<b>&lt;0.001</b>
	Concentration 10 mg/L	-0.095 (0.013)	-7.186	<b>&lt;0.001</b>
	Concentration 20 mg/L	0.087 (0.014)	6.020	<b>&lt;0.001</b>
	SexMale	0.057 (0.014)	4.012	<b>&lt;0.001</b>
	Concentration 5 mg/L: SexMale	0.057 (0.019)	2.954	0.003
	Concentration 10 mg/L: SexMale	-0.008 (0.019)	-0.446	0.648
	Concentration 20 mg/L: SexMale	-0.016 (0.021)	-0.759	0.447
	<b>Density of stage III oocytes</b>	Intercept	0.031 (0.004)	7.313
Concentration 5 mg/L		0.011 (0.007)	1.551	0.121
Concentration 10 mg/L		0.023 (0.008)	2.695	<b>0.007</b>
Concentration 20 mg/L		0.034 (0.010)	3.438	<b>&lt;0.001</b>
<b>Percentage of atresia</b>	Intercept	-1.091 (0.387)	-2.817	<b>&lt;0.001</b>
	Concentration 5 mg/L	0.146 (0.495)	0.296	0.767
	Concentration 10 mg/L	0.041 (0.508)	0.082	0.934
	Concentration 20 mg/L	0.536 (0.516)	-1.039	0.298

Bold values denote significant effects at  $p \leq 0.05$ .

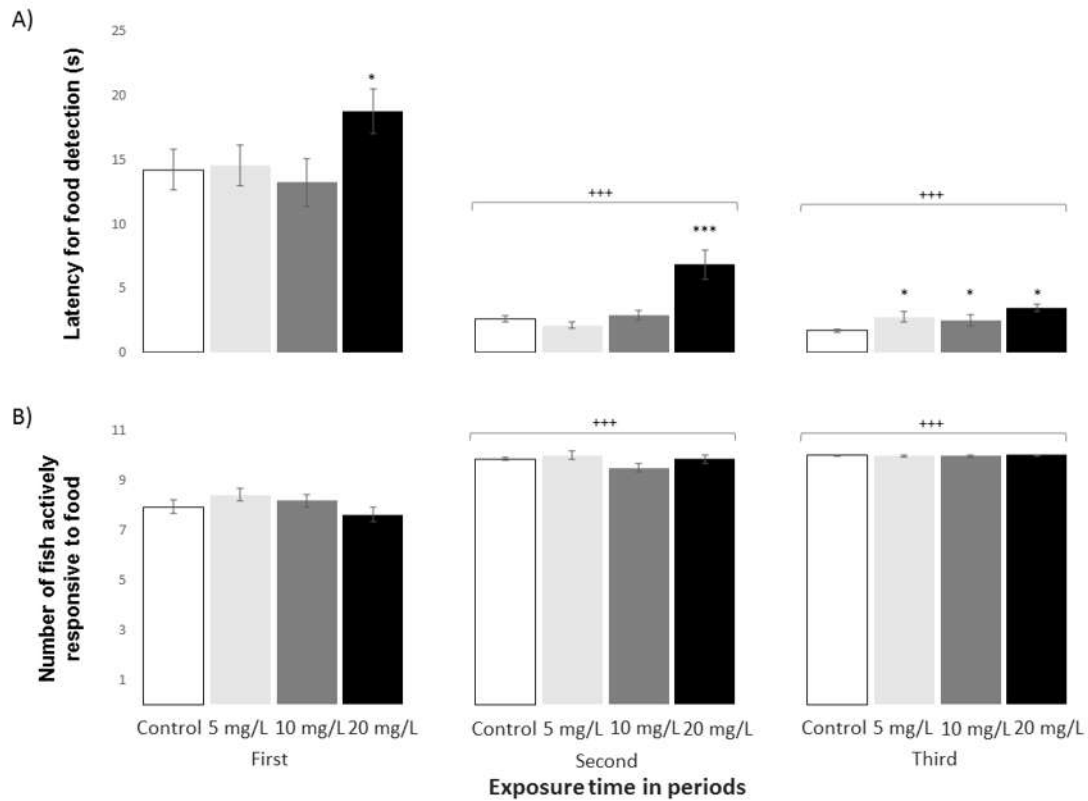
## Figure legends



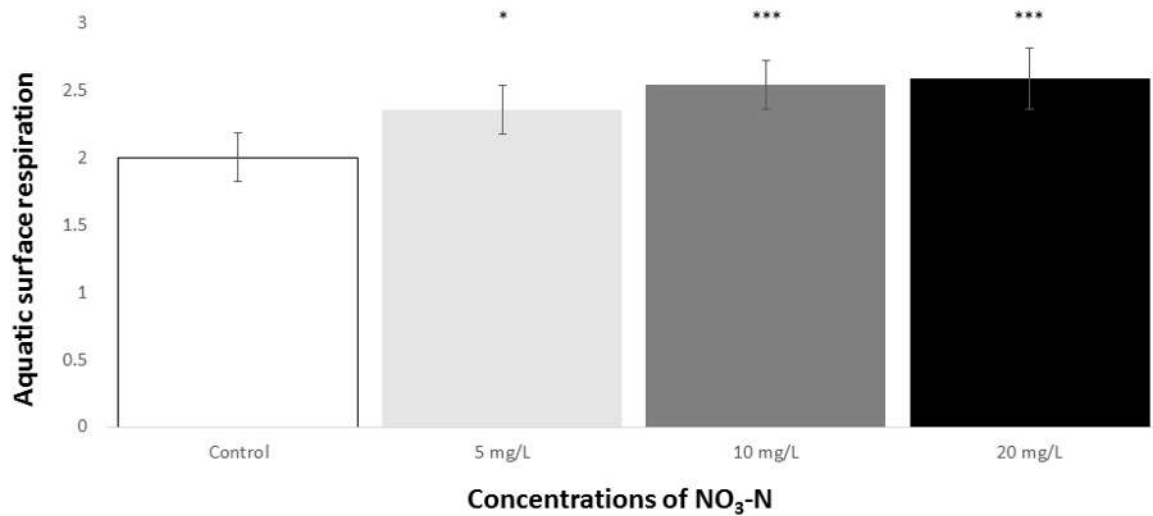
**Figure 1. Geographic location of the three basins and study sites in central Mexico:** Zacapu lake (19°49'29''N, 101°46'54''W), Mintzita spring (19°38'41''N, 101°16'27''W) and Chapultepec spring (19°34'23''N, 101°31'16''W). Each site are indicated by a star.



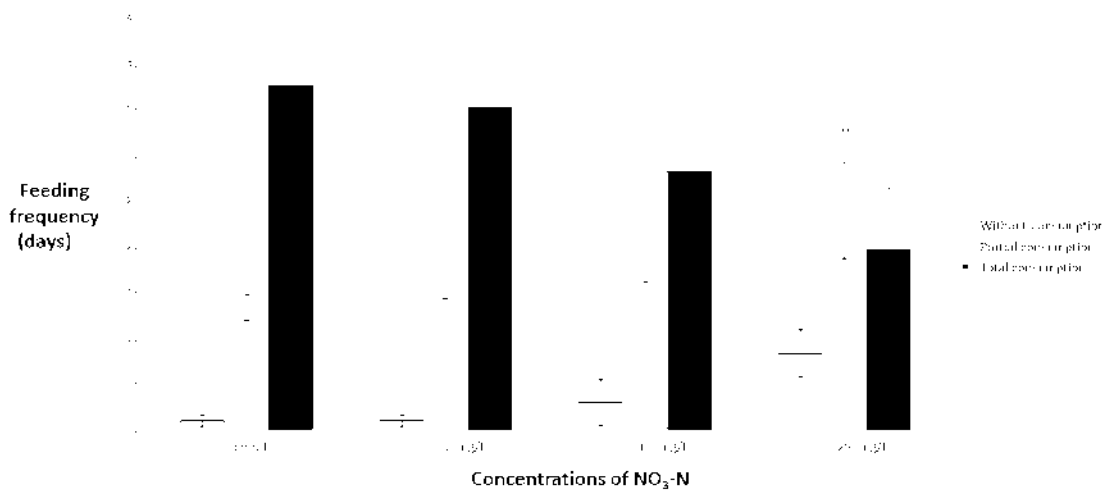
**Figure 2. Chronic exposure to ecologically relevant NO<sub>3</sub>-N concentrations diminished *Skiffia lermae* survival.** Kaplan-Meier survival curves show the survival rate for *Skiffia lermae* fish exposed to control (n=30), 5 (n=30), 10 (n=30) and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L concentrations (n=30). Log rank tests indicate a significant difference at 20 mg/L. Shading 95% confidence intervals. \*\*\*p ≤ 0.001.



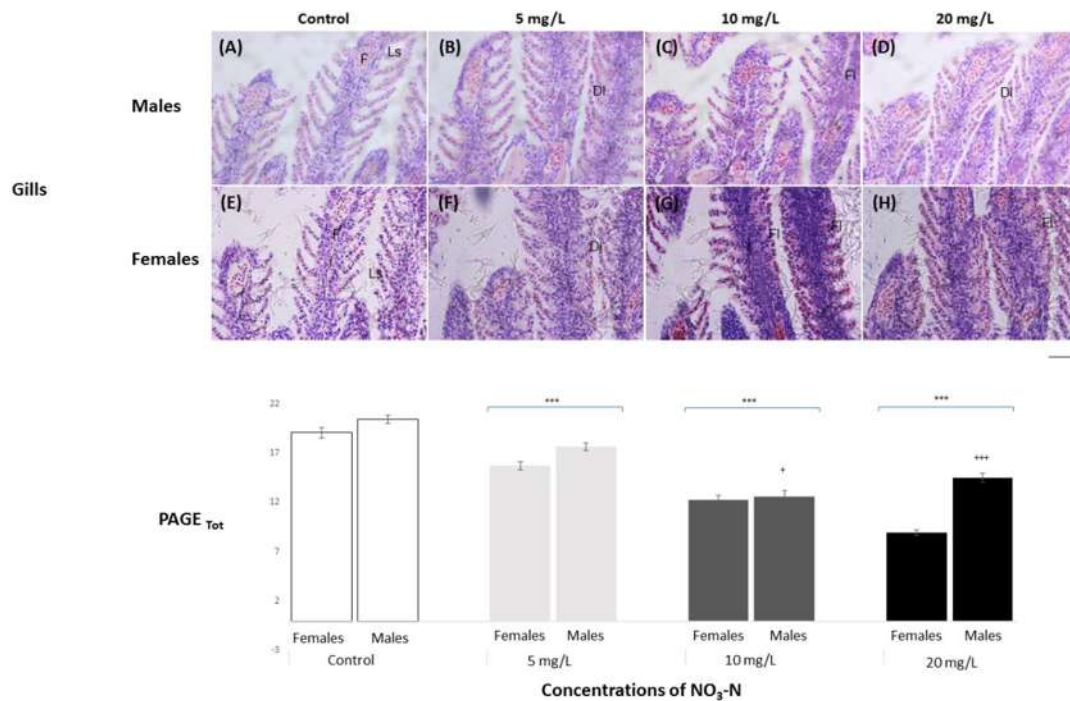
**Figure 3. Ecologically relevant  $\text{NO}_3\text{-N}$  concentrations caused alterations in *Skiffia lermae* behavior.** Graphs show the time required for food detection (latency/s, A) as well the number of fish actively responsive to food (B) during the first (1-20 days), second (21-40 days) and third exposure periods (41-60 days) at control (n=30), 5 (n=30), 10 (n=30) and 20 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  concentrations (n=30). \*\*\* $p \leq 0.001$ , first period vs. second and third periods; \* $p \leq 0.05$  and \*\*\* $p \leq 0.001$ , control vs. 5, 10 and 20 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ .



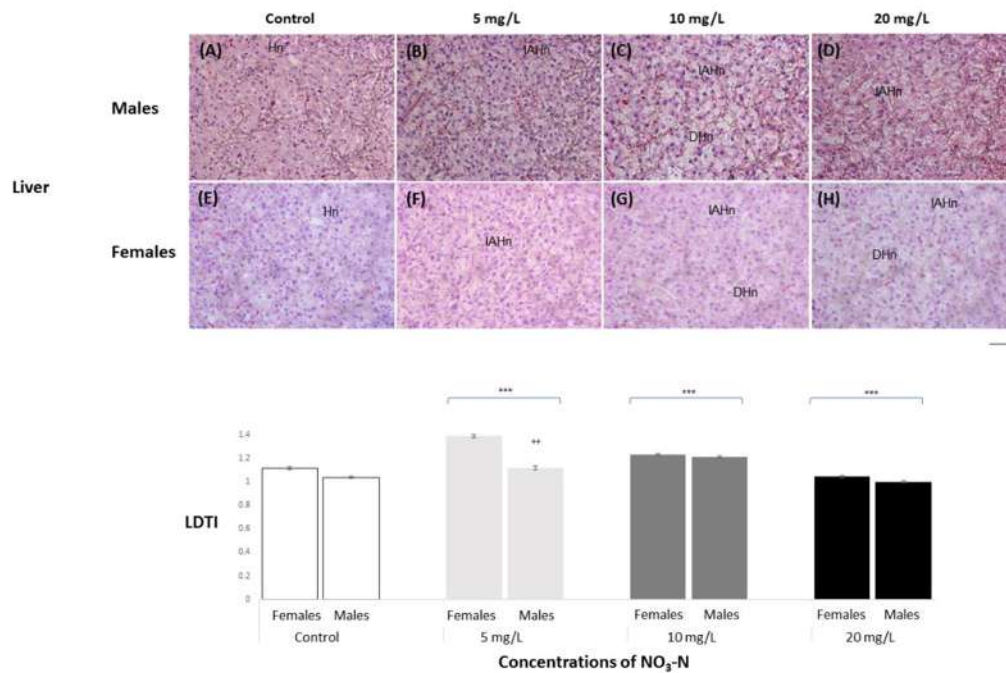
**Figure 4. Nitrate-nitrogen environmental relevant concentrations caused alterations in aquatic surface respiration (ASR) in *Skiffia lermæ*.** The graph shows the aquatic surface respiration at control (n=30), 5 (n=30), 10 (n=30) and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L concentrations (n=30). \*p ≤ 0.05 and \*\*\*p ≤ 0.001, control vs. 5, 10 and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L.



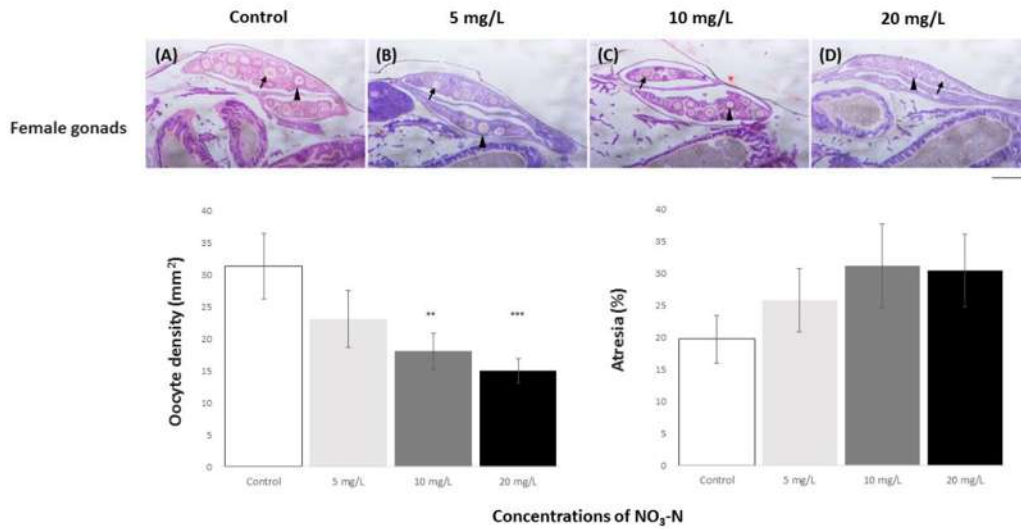
**Figure 5. Environmentally relevant NO<sub>3</sub>-N concentrations decrease food consumption in *Skiffia lermae*.** The graph shows the feeding frequency of fish exposed to control, 5 (n=30), 10 (n=30) and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L concentrations (n=30). \*\*p ≤ 0.01, control vs. 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L.



**Figure 6. *Skiffia lermae* fish show gill histomorphometric alterations at ecologically relevant NO<sub>3</sub>-N concentrations.** Representative gill histological sections from males (A-D) and females (E-H) exposed to control (n=5, A and E), 5 (n=5, B and F), 10 (n=5, C and G) and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L concentrations (n=5, D and H). DI, decreased interlamellar distance; F, filament; FL, fusion of secondary lamellae; Ls, secondary lamellae. Scale bar = 50  $\mu$ m. The graph shows the proportion of total epithelia available for gas exchange (PAGE<sub>Tot</sub>) in males and females exposed to control, 5, 10 and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L. +p  $\leq$  0.05 and \*\*\*p  $\leq$  0.001, females vs. males; \*\*\*p  $\leq$  0.001, control vs. 5, 10 and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L.



**Figure 7. *Skiffia lermae* fish show liver histomorphometric alterations at ecologically relevant NO<sub>3</sub>-N concentrations.** Representative liver histological sections from males (A-D) and females (E-H) exposed to control (n=5, A and E), 5 (n=5, B and F), 10 (n=5, C and G) and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L concentrations (n=5, D and H). DHn, decrease in hepatocyte nuclei; Hn, hepatocyte nucleus; IAhn, increase in the nuclear area of hepatocytes. Scale bar = 50  $\mu$ m. The graph shows the liver damage tissue index (LDTI) in males and females exposed to control, 5, 10 and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L. \*\*p  $\leq$  0.01, females vs. males; \*\*\*p  $\leq$  0.001, control vs. 5, 10 and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L.



**Figure 8. *Skiffia lermae* fish show ovarian histomorphometric alterations at ecologically relevant NO<sub>3</sub>-N concentrations.** Representative ovarian histological sections from females (A-D) exposed to control (n=5, A), 5 (n=5, B), 10 (n=5, C) and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L concentrations (n=5, D). Arrows, stage III oocytes; arrow head, atretic oocytes. Scale bar = 500  $\mu$ m. Graphs show the oocyte density (mm<sup>2</sup>, E) and atresia (%), F) in females exposed to control, 5, 10 and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L. \*\*p  $\leq$  0.01 and \*\*\*p  $\leq$  0.001, control vs.10 and 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L.

**Supplementary Table 1. Developmental stages of oocytes in the female gonads of viviparous fish.**

<b>Gonadal stage</b>	<b>Characteristics</b>
Stage I	Early primary growing oocytes with single or multiple nucleoli
Stage II	Oocytes of medium primary growth, they are characterized by the presence of Balbiani bodies
Stage II	Oocytes of late primary growth, they are characterized by the appearance of large oil droplets
Stage IV	Oocytes of primary secondary growth, they are characterized by the appearance of the first yolk globules
Stage V	Late growing oocyte, yolk droplets coalesce and form a large yolk globule which occupies most of the volume of the oocyte, at that time, the oil droplets are at the periphery of the ooplasm
Stage VI	oocytes fully developed, at this stage females are ready to mate

(Uribe-Aranzábal et al., 2012; Tinguely et al., 2019).

**Supplementary Table 2. Characteristics and classification of atretic oocytes.**

<b>Stages of atresia</b>	<b>Characteristics</b>
Alpha stage	It is characterized by alterations in the ovoplasm, proliferation of follicular cells and ruptures in the zona pellucida
Beta stage	It is characterized by a reduction of the ovoplasm by diffusion and its phagocytosis by follicular cells
Gamma stage	It is characterized because the follicular cells and the vascularized theca occupy the space of the oocyte
Delta stage	It is characterized by a progressive decrease in the volume of the atretic follicle

(Uribe-Aranzábal et al. 2006).

**Supplementary Table 3. Water quality (mean ± standard error; n= 60) measured in experimental aquariums for NO<sub>3</sub>-N treatments.**

<b>Water quality</b>	<b>Control</b>	<b>Exposure 5 mg/L</b>	<b>Exposure 10 mg/L</b>	<b>Exposure 20 mg/L</b>
NO <sub>3</sub> -N (mg/L)	2.084± 0.06 <sup>d</sup>	5.087± 0.08 <sup>c</sup>	9.314± 0.07 <sup>b</sup>	18.762± 0.164 <sup>a</sup>
NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	0.007± 0.0004 <sup>a</sup>	0.011± 0.001 <sup>a</sup>	0.011± 0.001 <sup>a</sup>	0.009± 0.0008 <sup>a</sup>
NH <sub>4</sub> -N (mg/L)	0.0028± 3.09e-05 <sup>a</sup>	0.0028± 3.17e-05 <sup>a</sup>	0.0029± 7.26e-05 <sup>a</sup>	0.0028± 3.02e-05 <sup>a</sup>
Temperature (°C)	21.956± 0.129 <sup>a</sup>	21.892± 0.129 <sup>a</sup>	21.951± 0.131 <sup>a</sup>	21.976± 0.127 <sup>a</sup>
Dissolved oxygen (mg/L)	6.385± 0.161 <sup>a</sup>	6.418± 0.159 <sup>a</sup>	6.470± 0.142 <sup>a</sup>	6.587± 0.139 <sup>a</sup>
Conductivity (us/cm)	277.461± 4.515 <sup>c</sup>	302.233± 3.786 <sup>c</sup>	346.553± 3.981 <sup>b</sup>	445.789± 5.762 <sup>a</sup>
Total dissolved compounds (mg/L)	207.076± 10.988 <sup>c</sup>	208.782± 2.633 <sup>c</sup>	239.281± 2.806 <sup>b</sup>	307.500± 3.784 <sup>a</sup>
Salinity (ppt)	0.140± 0.002 <sup>c</sup>	0.152± 0.001 <sup>c</sup>	0.176± 0.002 <sup>b</sup>	0.228± 0.002 <sup>a</sup>
pH	8.006± 0.044 <sup>a</sup>	7.982± 0.038 <sup>a</sup>	7.964± 0.0358 <sup>a</sup>	7.916± 0.034 <sup>a</sup>

Different letters indicate significant differences between treatments.

## VII. DISCUSIÓN GENERAL

La mayoría de las especies pertenecientes a la subfamilia Goodeinae están gravemente amenazadas (IUCN, 2023), debido a la contaminación de los cuerpos de agua donde se distribuye este grupo (De la Vega-Salazar et al., 2003; De la Vega-Salazar y Macías-García, 2005; Ramírez-Herrejón et al., 2012). La contaminación es uno de los principales problemas que enfrentan los seres humanos. Se define como la producción o introducción de sustancias o energía en el medio ambiente, que produzcan efectos nocivos para los recursos vivos (Bashir et al., 2020). Los ecosistemas acuáticos son los receptores de la contaminación antropogénica. Los ecosistemas de agua dulce están expuestos a una contaminación adicional, porque el agua se utiliza en diversas prácticas industriales, así como, en la liberación de los residuos municipales y de granjas de animales. El 80 % de las aguas residuales municipales sin un tratamiento previo, se vierten a los cuerpos de agua dulce. La agricultura explota el 70 % del agua a nivel mundial y las tierras agrícolas liberan enormes cantidades de agroquímicos (fertilizantes y pesticidas) a los cuerpos de agua (Hansen et al., 2017; Bashir et al., 2020). El nitrógeno es uno de los principales fertilizantes utilizados en la agricultura, su incremento en el medio ambiente ha provocado una perturbación del ciclo global del nitrógeno (Anexo 1). Entre los fertilizantes nitrogenados más utilizados, encontramos al nitrato-N, el cual es de los más detectados en los sistemas de aguas, debido a su facilidad de lixiviación del suelo fertilizado a los cuerpos de agua (Juntakut et al., 2020). El nitrato es un recurso fundamental para el desarrollo y crecimiento de los organismos vegetales y se presenta de manera natural como resultado de la deposición atmosférica, la descomposición de depósitos geológicos ricos en nitrógeno, la fijación del nitrógeno por cianobacterias y la degradación biológica de la materia orgánica (Camargo y Alonso, 2006; Baker et al., 2017). Sin embargo, las actividades humanas han provocado que las concentraciones de nitrato en los ecosistemas de agua dulce se incrementen, por lo que, este nutriente se considera un contaminante una vez que sobrepasa los niveles en los que ocurre de manera natural en un medio ambiente determinado (Kellock et al., 2018;

Simranjeet et al., 2022). La contaminación por nutrientes es uno de los principales problemas de degradación de los ecosistemas de agua dulce (Juntakut et al., 2020).

La mayoría de las pruebas para detectar toxicidad de los contaminantes acuáticos en los organismos, se realizan en especies modelo, como el pez cebra *Danio rerio*. Las decisiones de gestión, para establecer los límites permisibles de contaminantes, en las descargas de aguas residuales a ecosistemas de agua dulce, se basan en datos de sensibilidad de especies modelo. Sin embargo, sería crucial para efectos de conservación incorporar datos sobre la sensibilidad de especies endémicas en peligro de extinción (Anexo 2). La sensibilidad se define en términos de la susceptibilidad de las especies a cambios o perturbaciones, como resultado de una actividad humana o modificaciones en las condiciones ambientales (Van Treeck et al., 2020). En un contexto regional se sabe muy poco del efecto tóxico del nitrato sobre las especies de peces endémicas del Centro de México. Por ello, investigamos los efectos del nitrato en especies de la subfamilia Goodeinae. Esta subfamilia representa uno de los grupos dulceacuícolas más importantes del Centro de México, debido a sus características biológicas particulares (Domínguez-Domínguez y Pérez Ponce de León, 2007). Para llevar a cabo nuestra investigación seleccionamos cuatro especies de peces pertenecientes a esta subfamilia, las especies fueron colectadas en el mismo sitio, por lo que estuvieron sujetas a los mismos patrones de calidad del agua. La calidad del agua es un factor muy importante en la evaluación de la toxicidad. De acuerdo con Moore y Bringolf (2020) la sensibilidad de las especies puede variar según la dureza del agua utilizada en los experimentos. Presa et al. (2022) mencionan que el nitrógeno de nitrato (N-NO<sub>3</sub>) es más tóxico en ambientes de agua dulce. Los sólidos disueltos totales también podrían influir en una reducción de la toxicidad del N-NO<sub>3</sub>, cuando se encuentran en concentraciones superiores, esto debido a que, una mayor cantidad de sales disueltas en el agua provocan una menor absorción de iones nitrato por las branquias (Baker et al., 2017). Incluso, el mismo reactivo nitrato de sodio (NaNO<sub>3</sub>) utilizado para obtener las concentraciones deseadas de N-NO<sub>3</sub> puede tener un efecto negativo en los organismos, al incrementar la salinidad del medio. Por eso, no solo es importante informar la calidad de agua que se utilizó en los experimentos,

cuando se requiere comparar los resultados de las pruebas de toxicidad, sino también en términos de diseño experimental y robustez. Además, de las especies que se utilizan y de la calidad del agua, la etapa de vida es otro factor para tener en cuenta en las pruebas de toxicidad. Adelman et al. (2009) y Rueda-Jasso et al. (2017) mencionan que las primeras etapas de vida son más sensibles que los adultos, por lo que, los resultados en las primeras etapas de vida aseguran la supervivencia de todas las etapas de vida. Contrario a lo que reporta Hamlin (2006) donde los adultos son más sensibles que las primeras etapas de vida. En general, la sensibilidad en las diferentes etapas de vida de los organismos va a depender de la especie que se utiliza. Para las especies de la subfamilia Goodeinae se realizaron experimentos de toxicidad aguda tanto en las primeras etapas de vida, como en la etapa adulta y se observó que las primeras etapas de vida son más sensibles, debido a esto, hay que destacar la relevancia de utilizar las primeras etapas de vida en estas especies en experimentos futuros.

Los primeros resultados de esta investigación (Capítulo I) sobre la sensibilidad diferencial de los descendientes de las cuatro especies de goodeinos indican que las especies exhiben diferente sensibilidad a la exposición de N-NO<sub>3</sub>. Las diferencias en la sensibilidad encontradas pueden deberse a las características intrínsecas de cada especie, como la adsorción (tiempo de acumulación del nitrato en plasma), distribución, metabolismo y excreción (Spurgeon et al., 2020). Lo que permitió que tuvieran diferentes capacidades para sobrevivir y adaptarse a la exposición del N-NO<sub>3</sub>. Identificamos que las especies más sensibles (*Skiffia lermae* y *Xenotoca variata*) son las que presentan mayor daño en las branquias y las especies tolerantes mayor daño en el hígado (*Allophorus robustus* y *Goodea atripinnis*). De acuerdo con esta evidencia podemos plantear un escenario donde las especies que preservan la estructura y función branquial y conservan las funciones del hígado en términos de desintoxicación tienen mayores probabilidades de sobrevivir en ambientes contaminados. Además, nuestros resultados dan una explicación del porque *G. atripinnis* es la especie dentro de los goodeinos, con mayor rango de distribución en el Centro de México y que actualmente no esté en ninguna normativa para su protección. A diferencia de, *S. lermae* que fue la especie

con mayor sensibilidad, debido a que, presentó el menor valor de concentración letal 50, las mayores alteraciones de conducta y de los índices histopatológicos de branquias e hígado. Lo que refleja su susceptibilidad a la degradación ambiental y como consecuencia, la disminución en su rango de distribución. Cabe destacar que, el valor de concentración letal 50 para *S. lermae* sugiere que es la especie más sensible reportada actualmente.

El siguiente paso fue utilizar a la especie más sensible *S. lermae*, para determinar el efecto que les provoca la exposición a concentraciones de N-NO<sub>3</sub> reportadas en los ecosistemas acuáticos de agua dulce del Centro de México, sobre su supervivencia, conducta de alimentación, de respiración, crecimiento, conteo de células de la sangre y en los indicadores histopatológicos de branquias, hígado y gónadas. Este es el primer estudio que examina los efectos crónicos del N-NO<sub>3</sub> en una especie silvestre sensible. Nuestros resultados indican (Capítulo II) que se encontraron alteraciones en la conducta, daños histopatológicos en branquias e hígado a partir de la exposición a 5 mg/L de N-NO<sub>3</sub> y a partir de la exposición a 10 mg/L se observa un decremento en la densidad de ovocitos en etapa III. Por lo que, *S. lermae* podría ser considerada como una especie indicadora de buena calidad del agua.

Los resultados de la presente investigación no excluyen la posibilidad de que la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de N-NO<sub>3</sub> causarán otros efectos fisiológicos que no se midieron en este estudio, como alteraciones en las hormonas reproductivas o una alteración de los rasgos sexuales clave para las conductas sexuales (Secondi et al., 2013), cambios en la hemoglobina y metahemoglobina, que debido al pequeño tamaño de los organismos no se pudo obtener una muestra de sangre necesaria para realizar estos análisis. Además, es posible que en una exposición crónica o con un tiempo de exposición mayor al evaluado se puedan encontrar efectos significativos en el crecimiento y en el porcentaje de atresia de los ovocitos en las hembras, entre otros parámetros.

La NOM-001-SEMARNAT (2021), establece los límites máximos permisibles de nitrógeno total (N) de 25 mg/L diario y en promedio mensual de 15 mg/L en las

descargas de aguas residuales que van a los ecosistemas de aguas dulces. Esta norma tiene como objetivo regular la contaminación en los sistemas de agua dulce para proteger a los organismos que habitan esos lugares. Los resultados de la presente investigación hacen evidente que estos límites plantean un riesgo significativo para las especies sensibles.

Es muy probable que la contaminación por N-NO<sub>3</sub> se siga incrementando en los ecosistemas de agua dulce (Simranjeet et al., 2022), como se puede observar en el manantial La Mintzita, donde se registraron concentraciones desde 0.04 a 0.38 mg/L de N-NO<sub>3</sub> en las cuatro temporadas del año 2002 (Ortega-Murillo et al., 2007), comparadas con las reportadas por este trabajo (1.68 a 1.76 mg/L de N-NO<sub>3</sub>), donde las muestras de agua fueron colectadas en el mes de septiembre del 2023. Es necesario realizar monitoreos de la calidad de agua, en los cuerpos de agua donde se distribuyen las especies endémicas sensibles. De acuerdo con nuestros resultados, de los tres sitios donde se distribuye actualmente *S. lermae*, el Lago de Zacapu es el que presentó las menores concentraciones de los compuestos nitrogenados. Debido a que, cuenta con la presencia de muchos manantiales que le permiten un alto recambio de agua, una homogeneización continua y por lo mismo, evita la acumulación de desechos (Ramírez-García et al., 2021).

Realizar trabajos como el presente aportan información para poder comprender los impactos de los contaminantes ambientales y poder proteger a las especies endémicas más sensibles del Centro de México. Los datos generados en esta investigación aportan elementos para poder construir una regulación ambiental con una normatividad que incida en la conservación, de tal forma que el límite máximo permisible de N-NO<sub>3</sub> garantice las condiciones para la supervivencia, crecimiento y reproducción de las especies de peces endémicas de México.

## VIII. CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES

Con los resultados del presente trabajo se llegó a las siguientes conclusiones generales:

- Las cuatro especies de goodeinos estudiadas, de manera general, presentan una sensibilidad diferencial al N- $\text{NaNO}_3$ .
- Los indicadores histopatológicos y la conducta estudiados son los principales factores que contribuyen a explicar la sensibilidad diferencial entre las cuatro especies de goodeinos estudiadas.
- Las especies que preservan la función de las branquias y transfieren la tarea de desintoxicación al hígado podrían tener las mejores posibilidades de sobrevivir en ambientes contaminados.
- Las concentraciones de N- $\text{NO}_3$  reportadas en los ecosistemas de agua dulce del Centro de México (5, 10 y 20 mg/L) disminuyeron la supervivencia, el consumo de alimento, el índice de proporción de epitelio respiratorio disponible para realizar el intercambio gaseoso, producen daño hepático y un decremento en la densidad de ovocitos en etapa III de *S. lirmae*.
- Hay una respuesta diferencial a la exposición de concentraciones de N- $\text{NO}_3$  reportadas en los ecosistemas de agua dulce del Centro de México, dependiendo del sexo en *S. lirmae*.

Perspectivas:

- Los efectos del N- $\text{NO}_3$  sobre los peces de agua dulce del Centro de México en su mayoría son desconocidos, por lo tanto, falta mucho trabajo para poder conocer el panorama completo al que se enfrentan las especies silvestres sensibles en ambientes contaminados. Por lo que, esta investigación sentará una línea base en diferentes especies de goodeinos que abrirá muchas preguntas de investigación futura, como, por ejemplo: ¿Las especies de goodeinos que habitan de manera natural un mismo cuerpo de agua tienen una tolerancia diferencial a las concentraciones de nitratos? ¿A qué se debe

esto? ¿A la absorción por las branquias, a la excreción diferencial de cada organismo, a su capacidad de responder a estas alteraciones? ¿En caso de presentar diferentes grados de alteraciones en los órganos, a qué se debe? Si hay un efecto en la conducta, ¿esto terminará afectando la reproducción en especies donde el dimorfismo sexual y el cortejo son necesarios?

#### Recomendaciones:

- Se recomienda monitorear las concentraciones de  $\text{N-NO}_3$  en los cuerpos de agua dulce donde habitan los goodeinos e implementar estrategias de conservación que garanticen una buena calidad del agua.
- Se recomiendan concentraciones menores de 5 mg/L de  $\text{N-NO}_3$  para mantener en óptimas condiciones los cultivos de estos organismos bajo condiciones controladas.
- Será necesario realizar estudios enzimáticos, de estrés oxidante, de función metabólica y de niveles de hormonas sexuales para determinar con más precisión los efectos negativos del nitrato sobre la supervivencia de los goodeinos.
- Se necesita una reevaluación de las directrices que establecen los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a aguas dulces receptoras.

## IX. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Adelman, I., Kusilek, L., Koehle, J., y Hess, J. (2009). Acute and chronic toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the endangered topeka shiner (*Notropis topeka*) and fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 28, 2216-2223. doi: 10.1897/08-619.1
- Alan, J., y Castillo, M., (2007). Stream ecology. The structure and function of running waters. Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Alfaro, R. (2010). Estudio de la movilidad y toxicidad de metales pesados y arsénico en agua y sedimentos del Lago de Cuitzeo, Michoacán. Tesis doctoral. Centro interamericano de recursos del agua-facultad de ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Baker, J., Gilron, G., Chalmers, B., y Elphick, J. (2017). Evaluation of the effect of water type on the toxicity of nitrate to aquatic organisms. *Chemosphere*, 168, 435-440.
- Bashir, I., Lone, F., Bhat, R., Mir, S., Dar, Z., y Dar, S. (2020). Concerns and Threats of Contamination on Aquatic Ecosystems. *Bioremediation and Biotechnology*, 27, 1-26. doi: 10.1007/978-3-030-35691-0\_1. PMID: PMC7121614.
- Bjerregaard, P., Lund Kinnberg, L., Pedersen Mose, M., y Holbech, H. (2018). Investigation of the potential endocrine effect of nitrate in zebrafish *Danio rerio* and brown trout *Salmo trutta*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 211, 32-40.
- Bláha, L., y Hofman, J. (2020). Ecotoxicology of Environmental Pollutants. In: Filip J., T. Cajthaml, P. Najmanová, M. Cerník y R. Zboril (Eds.), *Advanced Nano-Bio Technologies for Water and Soil Treatment. Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future.* (pp. 549-572). Springer, Cham.

- Bukola, D., Zaid, A., Olalekan, E., y Falilu, A. (2015). Consequences of Anthropogenic Activities on Fish and the Aquatic Environment. *Poult Fish Wildl Sci*, 3, 138.
- Camargo, J., y Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International*, 32, 831-849.
- Camargo, J., y Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas*, 16(2), 98-110.
- Camargo, J., Alonso, A., y Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 58, 1255-1267.
- Cano-Rocabayera, O., Sostoa, A., Padrós, F., Cárdenas, L., y Maceda-Veiga, A. (2019). Ecologically relevant biomarkers reveal that chronic effects of nitrate depend on sex and life stage in the invasive fish *Gambusia holbrooki*. *Plos One*, 14(1), 1-18.
- Davidson, J., Good, G., Welsh, C., y Summerfelt, S. (2014). Comparing the effects of high vs. low nitrate on the health performance, and welfare of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* within water recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 59, 30-40.
- De la Vega-Salazar, M. (2005). Estado de conservación de los peces de la familia Goodeidae (Cyprinodontiformes) en la mesa Central de México. *Biología Tropical*, 54(1), 163-177.
- De La Vega-Salazar, M., Ávila-Luna, E., y Macías-García, C. (2003). Ecological evaluation of local extinction: the case of two genera of endemic Mexican fish. *Zoogoneticus* and *Skiffia*. *Biodiversity and Conservation*, 12(10), 2043-2056.

- De la Vega- Salazar, M., y Macías-García, C. (2005). Principal factors in the decline of the Mexican endemic livebearing fishes (Goodeinae: Goodeidae). *In: Uribe, M. C. & H. J. Grier (Eds.) Viviparous Fishes, Homestead, FL: New Life Publications. pp. 505-513.*
- Domínguez-Domínguez, O., y Pérez-Ponce de Leon, G. (2007). Los Goodeidos, peces endémicos del Centro de México. *Biodiversitas, 75*, 12-15.
- Domínguez-Domínguez, O., Zambrano, L., Escalera-Vázquez, L., Pérez-Rodríguez, R., y Pérez-Ponce de León, G. (2008). Cambio en la distribución de Goodeidos (Osteichthyes: Cyprinodontiformes: Goodeidae) en cuencas hidrológicas del centro de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad, 79(2)*, 501-512.
- Edwards, T., y Guillette, L. (2007). Reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from nitrate-contaminated springs in Florida. *Aquatic Toxicology, 85*, 40-47.
- Edwards, T., y Hamlin, H. (2018). Reproductive endocrinology of environmental nitrate. *General and Comparative Endocrinology, 265*, 31-40.
- Espinal-Carreón, T., Sedeño-Díaz, J., y López-López, E. (2013). Evaluación de la calidad del agua en la Laguna de Yuriria, Guanajuato, México, mediante técnicas multivariadas: un análisis de valoración para dos épocas 2005, 2009-2010. *Rev. Int. Contam. Ambie., 29(3)*, 147-163.
- Gomez Isaza, D., Cramp, R., y Franklin, C. (2020). Simultaneous exposure to nitrate and low pH reduces the blood oxygen-carrying capacity and functional performance of a freshwater fish. *Conservation Physiology, 8(1)*, 1-15.
- Hamlin, H. (2006). Nitrate toxicity in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Aquaculture, 253*, 688-693. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.08.025

- Hansen, B., Thorling, L., Schullehner, J. et al. (2017). Groundwater nitrate response to sustainable nitrogen management. *Sci Rep*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07147-2>
- IUCN, 2023. The IUCN red list of threatened species. Version 2022-2. Available online at: <https://www.iucnredlist.org> (accessed July 10, 2023).
- Juntakut, P., Haacker, E., Snow, D., y Ray, C. (2020). Risk and Cost Assessment of Nitrate Contamination in Domestic Wells. *Water*, 12, 428. <https://doi.org/10.3390/w12020428>
- Kellock, A., Moore, A., y Bringolf, R. (2018). Chronic nitrate exposure alters reproductive physiology in *fathead minnows*. *Environmental Pollution*, 232, 322-328.
- Kim, J., Yue, J., Kwang, K., Su, K., y Kim, J. (2019). Toxic effects of nitrogenous compounds (ammonia, nitrite, and nitrate) on acute toxicity and antioxidant responses of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 67, 73-78.
- Kroon, F., Streten, C., y Harries, S. (2017). A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. *PLoS ONE*, 12(4), 1-43.
- Kumar-Pathak, A. (2013). Water Pollution and Treatment. *International Journal of Environmental Engineering and Management*, 4(3), 191-198.
- Lyons, J., Piller, K., Artigas-Azas, J., Dominguez-Dominguez, O., Gesundheit, P., Köck, Medina-Nava, M., Mercado-Silva, N., García, A., y Findley, K. (2019). Distribution and current conservation status of the Mexican Goodeidae (Actinopterygii, Cyprinodontiformes). *ZooKeys*, 885, 115-158.
- Lyons, T., Máiz-Tomé, L., Tognelli, M., Daniels, A., Meredith, C., Bullock, R., y Harrison, L. (eds.). (2020). The status and distribution of freshwater fishes in Mexico. Cambridge, UK and Albuquerque, New Mexico, USA: IUCN and ABQ BioPark.

- Monsees, H., Klatt, L., Kloas, W., y Wuertz, S. (2017). Chronic exposure to nitrate significantly reduces growth and affects the health status of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture Research*, 48, 3482-3492.
- Moore, A. y Bringolf, R. (2020). Comparative Toxicity of Nitrate to Common and Imperiled Freshwater Mussel *Glochidia* and Larval Fishes. *Arch Environ Contam Toxicol*, 78, 536-544. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00708-z>.
- NOM-001-ECOL-2021 (Norma Oficial Mexicana). (2021). Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. México: Diario Oficial de la Federación. <http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/noticias> (accessed 25 July 2023).
- NOM-059-SEMARNAT-2001 (Norma Oficial Mexicana). (2021). Protección Ambiental, Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestres, Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio, Lista de Especies en Riesgo.
- Ortega-Murillo, M., Alvarado-Villanueva, R., Martínez- Sánchez, I., Arredondo-Ojeda, M., y Sánchez-Heredia, J. (2007). Estado trófico de la presa la Mintzita, Morelia, Michoacán, con base en la abundancia y distribución del fitoplancton. *Biológicas*, (9), 105-114.
- Parenti, L. (1981). A phylogenetic and biogeographic analysis of Cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 168, 335-557.
- Pereira, A., Carvalho, A., Cruz, C., y Saraiva, A. (2017). Histopathological changes and zootechnical performance in juvenile zebrafish (*Danio rerio*) under chronic exposure to nitrate. *Aquaculture*, 473, 197-205.
- Pérez-Díaz, J., Ortega-Escobar, H., Ramírez-Ayala, C., Flores-Magdaleno, H., Sánchez-Bernal, E., Can-Chulim, A., Mancilla-Villa, O. (2019).

Concentration of nitrate, phosphate, boron and chloride in the Lerma River. *Ecosist. Recur. Agropec.*, 6(16), 175-182.

- Pottinger, T. (2017). Modulation of the stress response in wild fish is associated with variation in dissolved nitrate and nitrite. *Environmental Pollution*, 225, 550-558.
- Presa, L., Neves, G., Maltez, L., Sampaio, L., Monserrat, J., Copatti, C., et al., (2022). Acute and sub-lethal effects of nitrate on haematological and oxidative stress parameters of juvenile mullet (*Mugil liza*) in freshwater. *Aquac. Res.*, 53, 3346-3357. doi: 10.1111/are.15842.
- Quezadas-Vivian, I. (2018). Calidad del agua del Parque La Zarcita y La Laguna de Zacapu Michoacán. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 86 pp.
- Ramírez-García, A., Moncayo-Estrada, R., González-Cárdenas, J., y Domínguez-Domínguez, O. (2021). Reproductive cycle of native viviparous fish species (Actinopterygii: Cyprinodontiformes: Goodeidae) in a subtropical Mexican lake. *Neotrop. Ichthyol.*, 19, 1–20. doi: 10.1590/1982-0224-2021-0105.
- Ramírez-Herrejón, J., Mercado-Silva, N., Medina-Nava, M., y Domínguez-Domínguez, O. (2012). Validación de dos índices biológicos de integridad (IBI) en la subcuenca del río Angulo en el Centro de México. *Revista Biología Tropical*, 60(4), 1669-1685.
- Secondi, J., Lepetz, V., Cossard, G., y Sourice, S. (2013). Nitrate affects courting and breathing but not escape performance in adult newts. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 67, 1757-1765.
- Simonyan, A., Gabrielyan, B., Minasyan, S., Hovhannisyanyan, G., y Aroutiounian, R. (2016). Genotoxicity of Water Contaminants from the Basin of Lake Sevan, Armenia Evaluated by the Comet Assay in Gibel Carp

(*Carassius auratus gibelio*) and Tradescantia Bioassays. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96(3), 309-313.

- Simranjeet, Singh, Anil, A., Kumar, V., Kapoor, D., Subramanian, S., Singh, J., y Ramamurthy, P. (2022). Nitrates in the environment: A critical review of their distribution, sensing techniques, ecological effects and remediation. *Chemosphere*, 287. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131996>.
- Sprague, B. (1990). Methods for fish biology. En C. Shreck y P. Moyle (Ed.), *Aquatic Toxicology* (pp. 491-593). American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, USA.
- Spurgeon, D., Lahive, E., Robinson, A., Short, S., y Kille, P. (2020). Species sensitivity to toxic substances: Evolution, ecology and applications. *Front. Environ.* 8:588380. doi: 10.3389/fenvs.2020.588380
- Tejerina-Garro, F., Maldonado, M., Ibañez, C., Pont, D., Roset, N., y Oberdorff, T. (2005). Effects of Natural and Anthropogenic Environmental Changes on Riverine Fish Assemblages: a Framework for Ecological Assessment of Rivers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(1), 91-108.
- Tilak, K., Veeraiah, K., y Raju, J. (2007). Effects of ammonia, nitrite and nitrate on hemoglobin content and oxygen consumption of freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Journal of environmental biology*, 28(1), 45-47.
- Tolleson, W. (2018). Mechanistic ecotoxicology and environmental toxicology. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 36(3), 164-166.
- Torno, J., Einwächter, V., Schroeder, J., y Schulz, C. (2018). Nitrate has a low impact on performance parameters and health status of on-growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in RAS. *Aquaculture*, 489, 21-27.

- Trujillo-Cárdenas, J., Saucedo-Torres, N., Zárate del Valle, P., Ríos-Donato, N., Mendizábal, E., Gómez-Salazar, S. (2010). Speciation and Sources of Toxic Metals in Sediments of Lake Chapala, Mexico. *J. Mex. Chem. Soc.*, 54(2), 79-87.
- Van der Oost, R., Beyer, J., y Vermeulen, N. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(57), 57-149.
- Van Treeck, R., Van Wichelen, J., y Wolter, C. (2020). Fish species sensitivity classification for environmental impact assessment, conservation and restoration planning. *Science of The Total Environment*, 708. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135173>.
- Yang, X., Peng, L., Hu, F., Guo, W., Hallerman, E., y Huang, Z. (2019). Acute and chronic toxicity of nitrate to fat greenling (*Hexagrammos otakii*) juveniles. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50,1016-1025.

## **X. ANEXOS**

**10.1- Anexo 1.** Artículo de divulgación publicado en la Revista Saber Más.

**El nitrógeno: tan esencial como tóxico**

## ARTÍCULO

# El nitrógeno: Tan esencial como tóxico

Ivette Marai Villa Villaseñor y Omar Domínguez Domínguez



**Ivette Marai Villa Villaseñor.** Estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

[imvillavi@hotmail.com](mailto:imvillavi@hotmail.com)

**Omar Domínguez Domínguez.** Profesor Investigador del Laboratorio de Biología Acuática de la Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

[goodeido@yahoo.com.mx](mailto:goodeido@yahoo.com.mx)

**H**ay sustancias, moléculas o compuestos que son vitales para nosotros o cualquier ser vivo, pero aunque parezcan inocuas, representan un riesgo para la salud, ya que depende de la cantidad que consumimos, tal es el caso del nitrógeno.

### ¿Qué es el nitrógeno?

Es el gas más abundante en el aire con una composición relativa de cerca del 78 %. **El nitrógeno constituye el 3.2 % de la masa del cuerpo humano** y es un elemento esencial, ya que forma parte de la estructura de los aminoácidos, por lo

tanto, de las proteínas y de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos, el ADN y el ARN. Las enzimas, que son moléculas proteicas, se encargan de las reacciones metabólicas de cualquier proceso que ocurre en nuestro organismo. Además, nuestro cuerpo sintetiza otras proteínas importantes como el colágeno, componente de la piel, articulaciones, huesos, músculos y dientes, responsable de darles resistencia. La hemoglobina es otra proteína que se encarga de transportar el oxígeno a todo nuestro cuerpo. El ADN contiene la información genética y el ARN es el que permite que esta información pueda ser comprendida por nuestras células. Como ves, **el nitrógeno forma parte esencial de todo nuestro cuerpo**, sin él, la vida como la conocemos no existiría.

### ¿Cómo los seres vivos obtienen nitrógeno?

El nitrógeno ingresa al medio ambiente como resultado de procesos naturales, mediante tormentas eléctricas y por la fijación realizada por microorganismos, como ciertas bacterias o algas, que transforman el nitrógeno presente en el aire en formas que pueden ser asimiladas por los seres vivos. Solo el nitrógeno en forma de amonio y nitrato es asimilable por las plantas a través de sus raíces y es incorporado para formar proteínas y ácidos nucleicos. Cuando los animales, incluidos los seres humanos, consumen plantas u otros animales, asimilan

este nitrógeno contenido en sus cuerpos. **Los organismos vivos devuelven el nitrógeno al medio ambiente en forma de metabolitos de desecho** que se incluyen en la orina o las heces, como la urea en los mamíferos y los humanos, el amoníaco en los peces y el ácido úrico en los reptiles y las aves. Además, cuando los organismos mueren, el nitrógeno contenido en su cuerpo se descompone por medio de las bacterias y se libera en forma de amoníaco, mientras que otras bacterias se encargan de convertir el amoníaco en nitrito y a su vez de nitrito a nitrato. Cuando hay un exceso de nitratos, hay bacterias que se encargan de convertir los nitratos a nitrógeno molecular y devolverlo al aire, y así vuelve a empezar el ciclo, el cual es muy complejo, pero gracias a él, dicho compuesto puede adquirir todas las formas y llegar a todas partes para que la vida continúe.

### ¿El nitrógeno es tóxico?

El nitrógeno no es tóxico en las cantidades en las que se encuentra naturalmente, debido a que existe un equilibrio entre la cantidad que ingresa al medio ambiente y la que se devuelve al aire o al agua. Sin embargo, **las actividades humanas se han encargado de romper ese equilibrio al incrementar el nitrógeno en el medio ambiente**, provocando contaminación y transformando al nitrógeno y a sus compuestos (amoníaco, amonio, ni-





trito y nitrato) en tóxicos. La contaminación por nitrógeno es causada principalmente por el desecho de sustancias como fertilizantes químicos usados en la agricultura, los producidos por la ganadería, la descarga de aguas residuales urbanas y el uso de combustibles fósiles, afectando así el equilibrio del nitrógeno en el aire, el suelo y el agua.

### **Efectos de cantidades elevadas de los compuestos nitrogenados**

Los animales terrestres y los seres humanos se exponen a los compuestos nitrogenados cuando entran en contacto con ellos, al inhalar, comer, beber o por contacto con la piel, mientras que los animales acuáticos siempre están en contacto con ellos, pues estos viven inmersos en un medio donde las sustancias están disueltas en el agua, la cual siempre está en contacto con su cuerpo y células.

En los ambientes acuáticos, provocan la acidificación de ríos y lagos. Las emisiones de óxidos de nitrógeno que provienen de la quema de combustibles fósiles, al entrar en contacto con el aire sufren un proceso de oxidación que da lugar a la formación de ácido nítrico y este, por medio de la lluvia llega al agua, al existir un incremento de este compuesto se reduce el pH del agua. Esta reducción es lo que se

conoce como acidificación. **Un pH bajo en el agua puede afectar las branquias de los organismos**, su principal órgano de respiración, lo que interfiere en el intercambio iónico y gaseoso y, en casos severos, les provoca la muerte por asfixia.

Otro efecto sobre la vida acuática está relacionado con las plantas que necesitan el nitrógeno para crecer y reproducirse. Si hay un exceso en el agua, las plantas y algas crecerán y se reproducirán más, pero esto puede tener un efecto negativo: al morir habrá mayor cantidad de materia orgánica en descomposición y, por lo tanto, más demanda de oxígeno para llevar a cabo ese proceso, o bien, que durante su fase de respiración, durante la noche, consuman cantidades muy elevadas de oxígeno. Esta mayor demanda puede llevar a una baja en el medio acuático, que en algunos casos, los hace inhabitables por la mayoría de los animales acuáticos. **¿Y qué pasa en los peces?** Una vez en el interior de los peces, el exceso de compuestos nitrogenados provoca diferentes efectos que a continuación te describimos:

**Efectos fisiológicos:** Provocan la metahemoglobinemia, una enfermedad caracterizada por la transformación de la hemoglobina a metahemoglobina,

una forma de hemoglobina incapaz de transportar oxígeno de manera eficiente. Se sabe que la muerte puede ocurrir a niveles superiores al 45 % de metahemoglobina y en peces sanos se puede observar que la metahemoglobina es inferior al 10 % de la concentración de la hemoglobina total. También puede presentarse estrés oxidativo, que es un desequilibrio entre los radicales libres y las enzimas antioxidantes, que son la primera línea de defensa de los organismos contra los radicales libres, lo cual, con el tiempo, puede dañar los tejidos y las células del organismo.

**Efectos morfológicos:** Provocan la alteración de las células y los tejidos, como un aumento de tamaño, acumulación de líquidos, e incluso la muerte de las células en los principales órganos expuestos, que son las branquias, el tracto gastrointestinal, el hígado y el riñón, lo que afecta la función normal de los órganos.

**Efectos en el sistema reproductivo:** Provocan una disminución en la concentración de hormonas tiroideas, que son formadas y secretadas por la glándula tiroidea, lo que afecta el crecimiento y desarrollo de los peces. Producen la inducción de vitelogenina en machos, lo que provoca una disminución en el tamaño del testículo y en el recuento de espermatozoides. La vitelogenina es una proteína específica de las hembras en estado reproductivo, que se sintetiza en el hígado y es transportada al ovario, en donde es incorporada dentro de los ovocitos, que son las células femeninas que están en proceso de convertirse en un óvulo maduro.

**Efectos conductuales:** Provocan una disminución

en la ingesta de alimento, frecuentes periodos de descanso, disminución en su velocidad de nado y pérdida de equilibrio.

### ¿Cuál es la cantidad segura de nitrógeno en el agua?

Los diferentes efectos en los peces van a depender principalmente de la cantidad y el tiempo de exposición. Entre más cantidad y más tiempo estén expuestos los peces a los compuestos nitrogenados, es más probable que cause la muerte de los organismos.

**La Norma Mexicana NOM-001-ECOL-1996 establece los límites máximos permisibles de nitrógeno** para proteger la vida acuática en las descargas de aguas residuales, la cual es de 15 mg/L en promedio mensual. Sin embargo, algunos cuerpos de agua rebasan estos valores máximos, como el río Lerma, donde se han registrado concentraciones de hasta 18 mg/L de nitrógeno. Otro ejemplo es el río Chiquito de Morelia, el cual atraviesa la ciudad y donde se puede encontrar concentraciones de 20 mg/L de nitrógeno. Estos números pueden no parecer importantes, pero si los comparamos con la concentración natural, como la que se encuentra en manantiales sin impacto humano, la cual en promedio es de 0.015 mg/L, ¡es hasta mil veces mayor!, ¿te imaginas?

El exceso de nitrógeno ocasiona graves daños en los ambientes acuáticos, por lo que grupos de investigación se han enfocado en evaluar la toxicidad del amoníaco, el nitrito y el nitrato en diferentes especies de peces y anfibios, como es el caso del Laboratorio de Biología Acuática de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.



Camargo J. y Alonso A. (2007). «Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático». *Ecosistemas*, 16(2), 98-110. <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?id=486>

Pacheco-Ávila J. y Cabrera-Sansores A. (2003). «Fuentes principales de nitrógeno de nitratos en aguas subterrá-

neas». *Ingeniería*, 7(2), 47-54. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=467/46770204>.

Pacheco-Ávila J., Pat-Canul R. y Cabrera-Sansores A. (2002). «Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y su efecto en los seres vivos». *Ingeniería*, 6(3), 73-81. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=467/46760308>

**10.2- Anexo 2.** Artículo de divulgación publicado en el Boletín de la Sociedad Científica Mexicana de Ecología.

**El impacto de los nitratos sobre la supervivencia de peces dulceacuícolas**



Consecuencia de contaminación en organismos de agua dulce. Fotografía: Chris F., Pexels

## El impacto de los nitratos sobre la supervivencia de peces dulceacuícolas

Ivette Marai Villa Villaseñor<sup>1</sup>, Esperanza Meléndez-Herrera<sup>2</sup>, Valentin Mar Silva<sup>3</sup> y Omar Domínguez-Domínguez<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

<sup>2</sup> Laboratorio de Ecofisiología Animal, Instituto de Investigaciones sobre Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

<sup>3</sup> Investigador por México-CONACYT. Laboratorio Nacional de Análisis y Síntesis Ecológica, Escuela Nacional de Estudios Superiores ENES, Universidad Nacional Autónoma de México. Morelia, Michoacán, México

<sup>4</sup> Laboratorio de Biología Acuática, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

### Resumen

Los ecosistemas de agua dulce son esenciales para la supervivencia de numerosas especies, incluido el ser humano. Desafortunadamente, como resultado de las actividades antropogénicas, estos sistemas están disminuyendo más rápido que los ecosistemas terrestres. Los nitratos son compuestos químicos capaces de alterar la calidad de vida de los organismos que viven en los cuerpos de agua o que se abastecen de ellos. Uno de los grupos zoológicos más representativos del centro de México es la subfamilia Goodeinae, la cual se encuentra representada por 41 especies de peces en distintos grados de amenaza. Los goodeinos presentan una distribución diferencial en los ecosistemas dulceacuícolas, presumiblemente asociada a su grado de contaminación. Con el objetivo de estudiar si la persistencia de los goodeinos en los diferentes cuerpos de agua del centro de México puede asociarse con diferente sensibilidad a los nitratos, realizamos ensayos de toxicidad aguda en cuatro especies de la subfamilia Goodeinae. Los criterios conductuales e histopatológicos separaron a las especies muy sensibles y menos sensibles a la exposición aguda. *Skiffia lermae* fue expuesta a concentraciones ecológicamente

relevantes de nitratos y fue la especie más sensible. Los resultados muestran que la exposición crónica a nitratos altera la conducta y la histología branquial y hepática desde concentraciones menores a los límites de nitratos permisibles para consumo humano.

### Palabras clave

alteración de la conducta, branquias, goodeinos, hígado, histopatología, impacto antropogénico, toxicidad aguda del nitrato

•••••

### Introducción

**D**espués de la pandemia, un momento histórico clave de esta primera mitad del siglo XXI, se hizo evidente una vez más la profunda relación del ser humano con el medio silvestre. Más aún, se puso de manifiesto cómo las consecuencias negativas de las actividades humanas pueden tener repercusiones a escala global y a un ritmo muy acelerado. Uno de los ejemplos más representativos de la rápida degradación de los ecosistemas es la contaminación de los cuerpos de agua. Dicha contaminación es una de las mayores amenazas para el mantenimiento de los ecosistemas de agua dulce y la supervivencia de los organismos que los habitan, como los peces.

Entre los contaminantes persistentes en los ecosistemas de agua dulce está el nitrógeno, un elemento fundamental para el desarrollo y crecimiento de las plantas. Sin embargo, su exceso y la omnipresencia de sus formas iónicas más comunes —el amonio, el nitrito y el nitrato— provocan severos problemas ambientales. El ion nitrato es la forma más estable y abundante de nitrógeno en los ecosistemas de agua dulce y se considera contaminante una vez que sobrepasa los niveles en los que se encuentra de manera natural. A diferencia de otros contaminantes emergentes (cuya presencia no es nueva, pero sí la preocupación de su impacto en los ecosistemas), como plaguicidas, residuos de medicamentos, hormonas y drogas, se ha demeritado el impacto del nitrato debido a que no alcanza concentraciones letales en ambientes naturales. No obstante, algunos estudios sugieren que las concentraciones de nitratos reportadas en varios ecosistemas de agua dulce pueden generar efectos tóxicos en los organismos (Edwards y Guillette 2007). Un efecto tóxico se manifiesta por cambios o alteraciones que afectan la función normal de un organismo y dependen principalmente de la concentración de exposición y de la sensibilidad de las especies. Los niveles de nitrato presentes en cuerpos de agua del centro de México como resultado de procesos naturales y de actividades agropecuarias, ganaderas, industriales y domésticas, pueden alcanzar los 18 mg/L. Éste es el caso de uno de los sistemas dulceacuícolas más contaminados, el río Lerma, en el cual el número de especies se ha reducido notablemente en las últimas décadas (Lyons *et al.* 2019).

El centro de México es una región importante en diversidad de ecosistemas acuáticos, los cuales albergan una alta riqueza de especies de peces. La mayoría de estas especies son endémicas, como todas las de la subfamilia Goodeinae. Este grupo de peces se considera

uno de los más representativos de la zona y sus especies se encuentran en diferentes niveles de riesgo de extinción. Se ha propuesto que la contaminación es una de las causas del declive de algunas de las poblaciones de goodeinos en el centro de México (Lyons *et al.* 2019). De acuerdo con la IUCN (2023), de las aproximadamente 41 especies de goodeinos, 13 están en peligro de extinción crítico, 14 en peligro, seis son vulnerables, dos están extintas en estado silvestre y una extinta.

De acuerdo con criterios ecológicos, *Skiffia lermae*, *Xenotoca variata*, *Goodea atripinnis* y *Allophorus robustus* son goodeinos con diferente sensibilidad a la perturbación de su ambiente (Lyons *et al.* 2000; Figura 1). Especies como *S. lermae* y *A. robustus* persisten en ambientes poco contaminados, como manantiales, mientras que otras, como *X. variata* y *G. atripinnis*, se distribuyen ampliamente en ambientes con diferentes niveles de perturbación. De acuerdo con estos patrones de distribución, *S. lermae* y *A. robustus* son especies clasificadas como sensibles, la primera amenazada y la segunda vulnerable. Por su parte, *X. variata* y *G. atripinnis* se consideran especies tolerantes y en preocupación menor. Con el objetivo de evaluar si esta distribución está asociada con una sensibilidad diferencial a los nitratos, realizamos ensayos de toxicidad aguda durante 96 horas a concentraciones letales en las cuatro especies de goodeinos (Villa-Villaseñor *et al.* 2022). Una vez identificada la especie más sensible, se realizaron ensayos de exposición crónica durante dos meses a concentraciones subletales y ecológicamente relevantes.



**Figura 1.** Fotografías representativas de las especies de la subfamilia Goodeinae. *Skiffia lermae* (A); *Xenotoca variata* (B); *Goodea atripinnis* (C); *Allophorus robustus* (D). Barra de escala= 5 mm

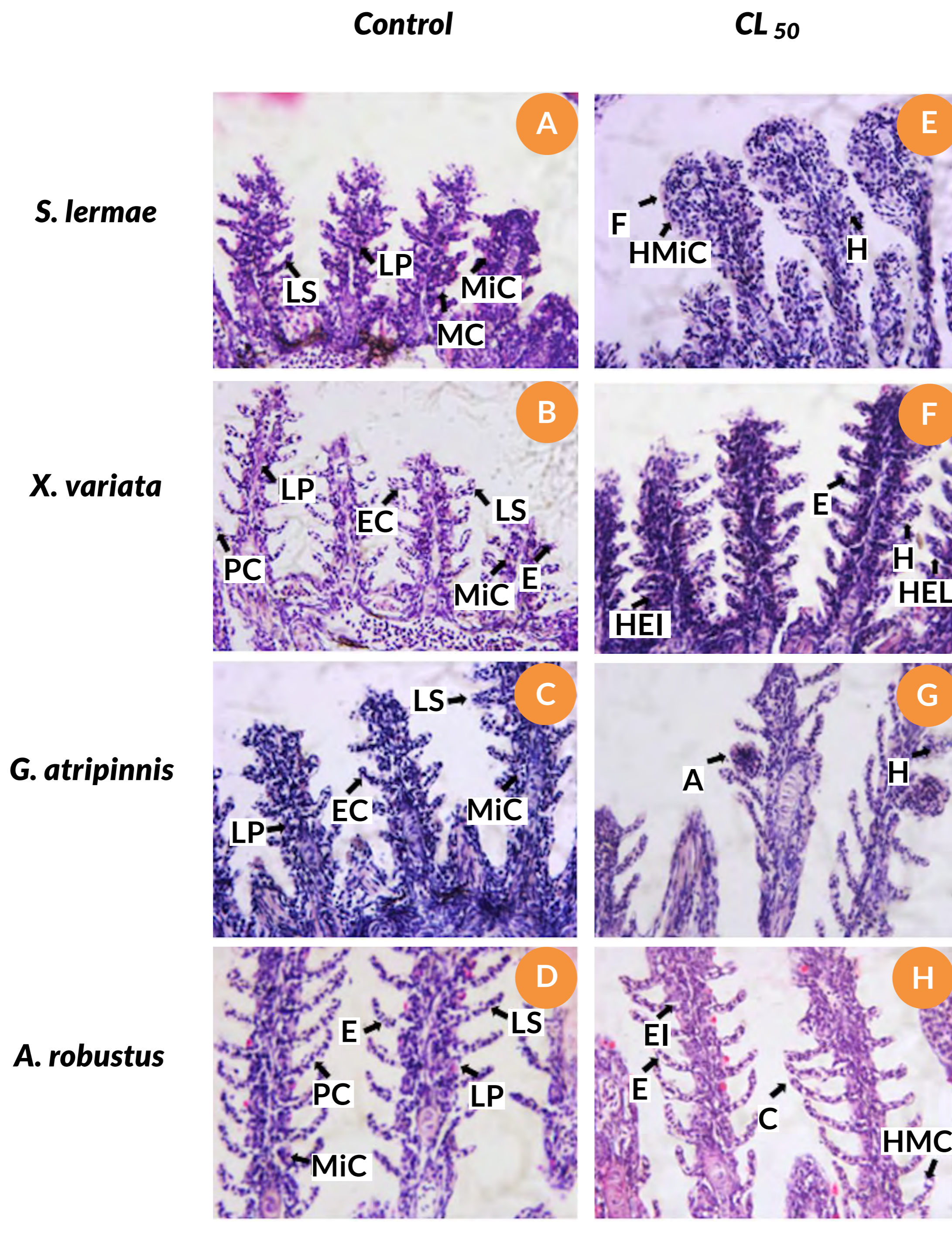
### Sensibilidad diferencial a la exposición aguda a los nitratos en especies de la subfamilia Goodeinae

En todas las especies se evaluó la supervivencia, la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), que es la concentración a la cual muere el 50% de la población experimental en 96 horas, las alteraciones en la conducta de nado, así como las alteraciones histopatológicas en las branquias y el hígado. Estas medidas se utilizaron para calcular un índice de respuesta integrada que permitiera obtener una mejor perspectiva del daño del contaminante en el organismo.

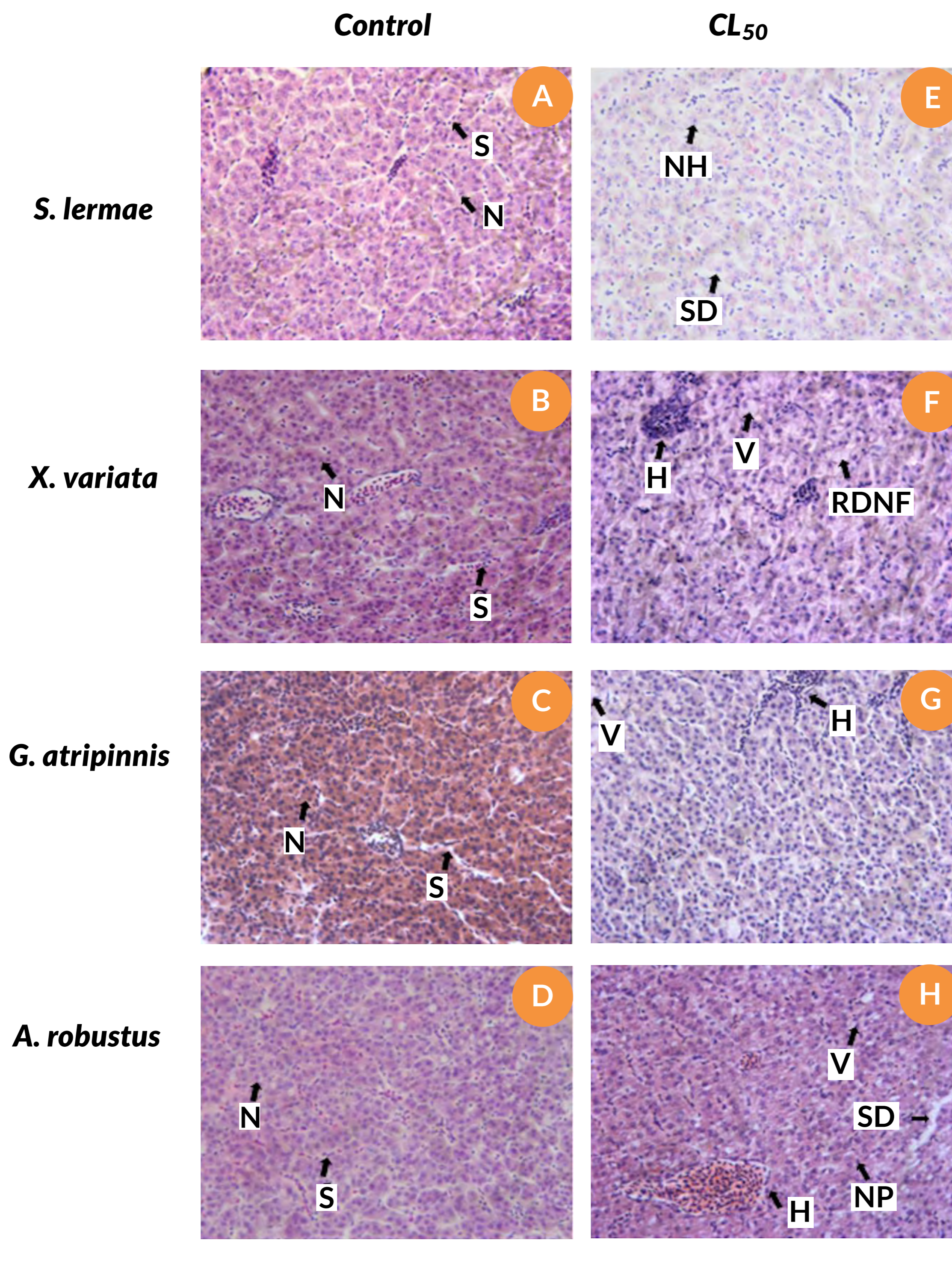
Fue posible observar que las especies presentan una sensibilidad diferencial a la exposición a nitratos en todas las variables evaluadas. *Skiffia lermae* y *X. variata* presentaron una disminución significativa en su supervivencia a menores concentraciones de nitrato y en un menor tiempo de exposición. En cambio, la supervivencia de *G. atripinnis* y *A. robustus* disminuyó a concentraciones más altas. De acuerdo con lo esperado, *S. lermae* presentó el menor valor de CL<sub>50</sub> y *A. robustus* el mayor. Al comparar los valores de CL<sub>50</sub>, la especie con el valor más bajo se considera la especie más sensible.

Otro parámetro que se evaluó fue la conducta de nado. Esta conducta es muy sensible a alteraciones en el intercambio gaseoso. Los primeros cambios incluyen el desplazamiento de los peces hacia la superficie de la columna de agua, y si la deficiencia de oxígeno continúa o se hace más pronunciada, los peces se van al fondo. La especie *S. lermae* presentó alteraciones conductuales a menores concentraciones de nitrato y a menor tiempo de exposición, seguida de *X. variata*. Por el contrario, *G. atripinnis* y *A. robustus* presentaron alteraciones conductuales a mayores concentraciones y a tiempos de exposición más largos. Entre estas dos especies, *G. atripinnis* presentó la menor alteración en la conducta a la misma concentración y tiempo de exposición al nitrato.

La principal vía de absorción de los nitratos en los peces son las branquias. Estos órganos son los encargados del intercambio gaseoso (oxígeno-dióxido de carbono) y se encuentran en contacto permanente y directo con el medio acuoso y las sustancias contenidas en él (Evans *et al.* 2005). El hígado es un órgano que participa en la detoxificación de contaminantes provenientes del tracto gastrointestinal y las branquias. Observamos que *S. lermae* presentó alteraciones en las branquias con una importancia patológica marcada (*i.e.*, pérdida parcial o total de la función del órgano. Figura 2) a menudo irreversible (Bernet *et al.* 1999). En contraste, el resto de las especies presentaron alteraciones mínimas (*G. atripinnis* y *A. robustus*) a moderadas (*X. variata*) en las branquias (Figura 2), las cuales en su mayoría pueden ser reversibles si el contaminante es retirado. Con respecto al hígado, *X. variata* fue la especie que presentó mayor daño, seguida de *S. lermae*; mientras que la especie con el menor daño fue *G. atripinnis* (Figura 3). En conjunto, el análisis integrado de todos los biomarcadores muestra que la especie más sensible es *S. lermae* y la menos sensible es *G. atripinnis* (Villa-Villaseñor *et al.* 2022).



**Figura 2.** Fotografías representativas de cortes histológicos de branquias de peces de la subfamilia Goodeinae expuestos a nitratos. Organismos control (A-D); organismos expuestos a concentraciones letales 50 (CL<sub>50</sub>) de nitratos (E-H. Modificado de Villa-Villaseñor *et al.* 2022). A, Aneurisma de lamelas secundarias; C, Curvatura de lamelas secundarias; E, Edema de lamelas secundarias; EC, Células epiteliales; EI, Edema del epitelio interlamelar; F, Fusión de lamelas secundarias; H, Hiperemia de lamelas secundarias; HEI, Hiperplasia del epitelio interlamelar; HEL, Hiperplasia del epitelio lamelar; HMC, Hiperplasia de las células de moco; HMiC, Hiperplasia de las células ricas en mitocondrias; MC, Células de moco; MiC, Células ricas en mitocondrias; PC, Células pilares; PL, Lamela primaria; SL, Lamela secundaria. Barra de escala = 50  $\mu$ m.



**Figura 3.** Fotografías representativas de cortes histológicos de hígado de peces de la subfamilia Goodeinae expuestos a nitratos. Organismos control (A-D); organismos expuestos a concentraciones letales 50 (CL<sub>50</sub>) de nitratos (E-H. Modificado de Villa-Villaseñor *et al.* 2022). H, hiperemia; N, núcleo del hepatocito; NH, hipertrofia nuclear; NP, núcleos picnóticos; RDNF, reducción en la densidad nuclear de hepatocitos; S, sinusoides; SD, dilatación de sinusoides; V, vacuolización del citoplasma. Barra de escala = 50  $\mu$ m

Los criterios conductuales e histológicos apoyan la clasificación ecológica para *S. lermae* y *G. atripinnis*. Sin embargo, es evidente que *X. variata*, una especie previamente considerada como tolerante debido a su amplia distribución geográfica, presenta bioindicadores de alta sensibilidad a los nitratos. Por su parte, *A. robustus*, una especie considerada como sensible a la contaminación ambiental, presenta mayor resistencia a la exposición a los nitratos.

La aplicación de concentraciones ecológicamente relevantes de nitratos (10 y 20 mg/L de nitrato de sodio durante dos meses) en *S. lermae*, la especie que resultó ser la más sensible en el experimento anterior, muestra que los individuos tratados presentan alteraciones conductuales y marcadores histopatológicos en branquias e hígado a concentraciones de 10 mg/L. Esta concentración es aún menor que el límite permisible de nitratos en agua para uso y consumo humano de 11 mg/L (Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-127-SSA1-2017). Lamentablemente, no existen aún en México criterios ecológicos de calidad de agua que establezcan los límites permisibles para la protección de la vida acuática en ecosistemas dulceacuícolas. Nuestros resultados son un referente importante.

### ¿Qué tienen en común las especies más sensibles, y en qué difieren de las menos sensibles?

Los resultados sugieren que aquellas especies que presentan un mayor daño branquial alteran su conducta de nado para compensar la deficiencia de oxígeno y esto disminuye su capacidad para sobrevivir. Por su parte, aquellas especies que presentan mayor daño hepático y preservan la función branquial tienen mayores posibilidades de sobrevivir en altas concentraciones de nitratos. Nuestros resultados de ninguna manera sugieren que los peces con menor sensibilidad a los nitratos están en menor riesgo que los peces más sensibles. Por el contrario, ponen de manifiesto la relevancia de realizar estudios de este tipo que integren las observaciones ecológicas con ensayos toxicológicos y bioindicadores conductuales y fisiológicos. Más aún, nuestros resultados resaltan la urgencia de establecer criterios de calidad del agua que incluyan las necesidades fisiológicas de los organismos que habitan los ecosistemas dulceacuícolas con el objetivo de aminorar la pérdida de especies y preservar la integridad funcional de los cuerpos de agua de México.

### Agradecimientos

Agradecemos a las instituciones que financiaron nuestra investigación: al CONACYT, al Proyecto FishArk México, al zoológico de Chester en Inglaterra, al grupo de trabajo de goodeidos (Goodeid Working Group), al Fondo de Conservación de Especies Mohammed Bin Zayed y a la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

**Literatura citada:**

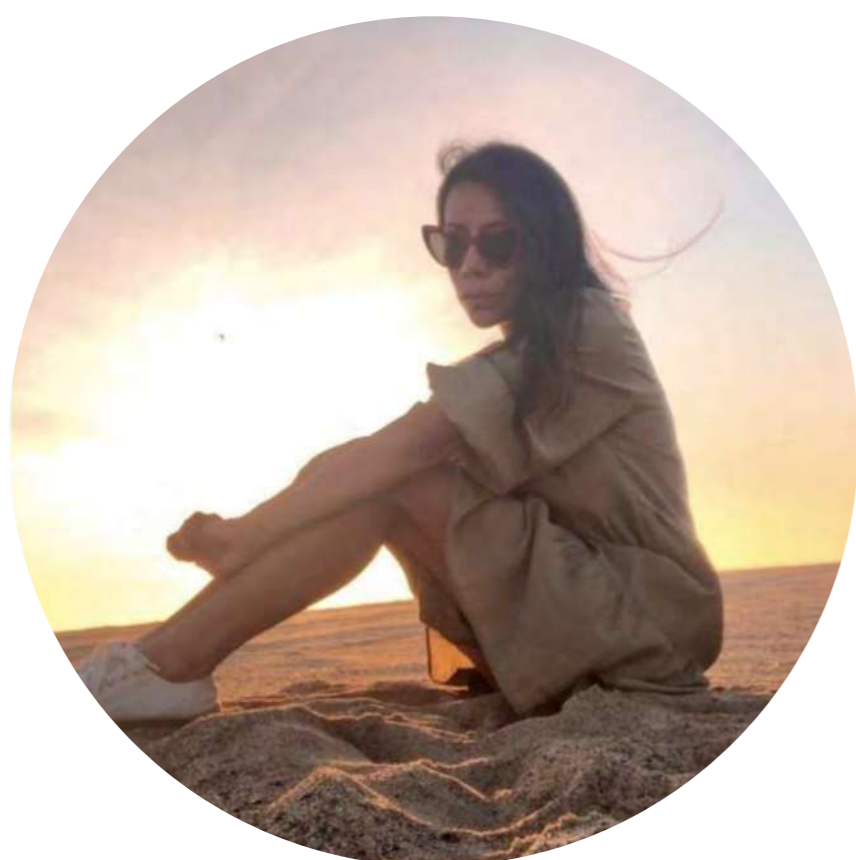
- Bernet D *et al.* 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22:25-34.
- Edwards T, Guillette L. 2007. Reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from nitrate-contaminated springs in Florida. *Aquatic Toxicology*, 85:40-47.
- Evans D, Piermarini P, Choe K. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Review*, 85:97-177.
- IUCN. (2023). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. Consultado el 28 de enero de 2023 de <https://www.iucnredlist.org>.
- Lyons J *et al.* 2000. Development of a preliminary index of biotic integrity based on fish assemblages to assess ecosystem condition in the lakes of central Mexico. *Hydrobiologia*, 418:57-72.
- Lyons J *et al.* 2019. Distribution and current conservation status of the Mexican Goodeidae (Actinopterygii, Cyprinodontiformes). *ZooKeys*, 885:115-158.
- Villa-Villaseñor IM *et al.* 2022. Differential sensitivity of offspring from four species of goodeine freshwater fish to acute exposure to nitrates. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10: 1-14.

## ¿Quién escribe?



Contacto:  
[0620850k@umich.mx](mailto:0620850k@umich.mx)

**Ivette Marai Villa Villaseñor** es Bióloga (2013) y Maestra en Ciencias (2016) por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) y actualmente candidata a doctora dentro del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas de la UMSNH, interesada en entender cómo los contaminantes alteran los ecosistemas dulceacuícolas a través de estudios ecotoxicológicos. Ha incursionado en líneas de investigación de salud animal, conductual, conservación, ecofisiología y ecotoxicología.



Contacto:  
[emelendez@umich.mx](mailto:emelendez@umich.mx)

**Esperanza Meléndez Herrera** es profesora e investigadora, interesada en los mecanismos y negociaciones que deben realizar los organismos para ajustarse a los ambientes modificados. Actualmente coordina el laboratorio de Ecofisiología Animal del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales de la UMSNH y es responsable de las líneas de investigación Neuroinmunología de la conservación en tortugas marinas y Modulación de la respuesta inmunológica como estrategia neuroprotectora.



Contacto:  
[0301880k@umich.mx](mailto:0301880k@umich.mx)

**Valentin Mar Silva** es Biólogo (2011), Maestro en Ciencias (2015) y Doctor en Ciencias (2021) por la UMSNH. Cuenta con tres capítulos de libro, cinco publicaciones indizadas, siete publicaciones de divulgación, dos codirecciones de tesis de licenciatura concluidas y cuatro en desarrollo. Ha incursionado en las líneas de investigación de ecología de comunidades y ecología trófica, lo cual le permite proponer y llevar a cabo proyectos enfocados en entender la estructura y función de comunidades biológicas para explorar cómo los diferentes cambios afectan a la biodiversidad y a los servicios ecosistémicos que proveen los sistemas naturales.



Contacto:  
[omar.dominguez@umich.mx](mailto:omar.dominguez@umich.mx)

**Omar Domínguez Domínguez** es Profesor Investigador titular C de tiempo completo en la Facultad de Biología de la UMSNH desde 1998. Sus líneas de investigación son la biología evolutiva y conservación, filogeografía, filogenia, taxonomía, sistemática y biogeografía.