



ORIGINAL ARTICLE /ARTÍCULO ORIGINAL

HISTORICAL ECOTOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF SAN JUAN ECOSYSTEM, SANTIAGO DE CUBA, CUBA

EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA HISTÓRICA DEL ECOSISTEMA SAN JUAN, SANTIAGO DE CUBA, CUBA

George Argota¹, Humberto Argota² & José Iannacone³

¹ Laboratorio Ecotoxicología. Grupo de Estudios Preclínicos. Centro de Toxicología y Biomedicina. Universidad de Ciencias Médicas. Santiago de Cuba, Cuba.

² Departamento Técnico. Laboratorio de Minerales - Geominera Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.

³ Laboratorio de Ecofisiología Animal. Universidad Nacional Federico Villareal (UNFV) - Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma (URP). Lima, Perú

Correo electrónico: george.argota@gmail.com/joseiannacone@gmail.com

The Biologist (Lima), 2013, 11(2), jul-dec: 251-265.

ABSTRACT

Currently, the environmental decision-making related to watershed preservation is oriented under the precepts of an historical environmental assessment. The objective of this research was to conduct a historical ecotoxicological assessment of the San Juan de Santiago de Cuba ecosystem. This was considered a systematic environmental monitoring which ran from 2010 to 2013, made quarterly. Physicochemical parameters such as electrical conductivity, total alkalinity, total hardness, pH, total solids, dissolved oxygen, biochemical oxygen demand and chemical oxygen demand were determined. All parameters of environmental risk prediction were performed using the GECOTOX program. The concentrations of Cu, Zn, Pb and Cd on three target organs (brain, gills and liver) in the biomonitor adult *Gambusia punctata* (Poeciliidae) were analyzed. In this species, the effect of total protein and enzymatic activity of acetylcholinesterase as biomarkers were evaluated. In general, the parameters were outside the values set used by the Cuban quality standards. The GECOTOX program said that the waters of the San Juan ecosystem presented a high rate of risk. The highest concentrations of metals were determined in the gills, liver and brain, respectively. Biomarker values were high, being higher for females. Finally, it was concluded that from one year to another all responses were ascending; thus, the San Juan ecosystem presented ecotoxicological effects in time.

Keywords: aquatic system, ecotoxicology, environmental assessment, San Juan, Santiago de Cuba.

RESUMEN

Actualmente, la toma de decisiones ambientales referidas a preservar las cuencas hidrográficas está orientada bajo los preceptos de una evaluación ambiental en el tiempo o histórica. El objetivo del presente trabajo de investigación fue realizar una evaluación ecotoxicológica histórica del ecosistema San Juan de Santiago de Cuba. Para ello fue considerado un monitoreo ambiental sistemático, el cual transcurrió desde el 2010 al 2013, con frecuencia trimestral. Se determinaron parámetros físico-químicos como conductividad eléctrica, alcalinidad total, dureza total, pH, sólidos totales, oxígeno disuelto, demanda bioquímica de oxígeno y demanda química de oxígeno. Con todos los parámetros se realizó una predicción de riesgo ambiental, utilizando el programa GECOTOX. Se analizó las concentraciones de Cu, Zn, Pb y Cd en tres órganos diana: cerebro, branquias e hígado en adultos del biomonitor *Gambusia punctata* (Poeciliidae). Se evaluó en esta especie, biomarcadores de efecto como proteínas totales y actividad enzimática de la acetilcolinesterasa. En general, los parámetros estuvieron fuera del valor establecido por la norma de calidad Cubana utilizada. El programa GECOTOX, indicó que las aguas del ecosistema San Juan, presentó un riesgo de tipo alto. Las mayores concentraciones de metales se determinaron en las branquias, hígado y cerebro, respectivamente. Los valores de biomarcadores fueron elevados, siendo mayores para las hembras. Finalmente se concluyó, que de un año a otro todas las respuestas fueron ascendentes, pudiendo señalarse que el ecosistema San Juan, presentó efectos ecotoxicológicos en el tiempo.

Palabras clave: ecotoxicología, evaluación ambiental, San Juan, Santiago de Cuba, sistema acuático.

INTRODUCCIÓN

En condiciones naturales, las aguas superficiales han sido por excelencia el reservorio final de descarga para residuales antropogénicos, afectando directamente la biodiversidad acuática donde puede mencionarse por ejemplo; las condiciones de confort, alimentación, defensa contra agentes patógenos, reacciones ante estímulos, entre otros aspectos, representando todo ello siendo sin duda alguna, desequilibrio no solo para el bienestar animal; sino además en la salud ecosistemas (Öztürk *et al.* 2009). Asimismo, históricamente la salud o calidad ambiental de los ecosistemas acuáticos, ha estado referido a la determinación de los parámetros físico-químicos de calidad del agua (Ramírez *et al.* 2008). Sin embargo, las fluctuaciones de los parámetros físico-químicos pueden ser tan normales que cualquier tipo de contaminación natural puede traer en consecuencia, malas

interpretaciones del comportamiento o salud ambiental de los ecosistemas (Lakshmanan *et al.* 2009).

Considerando lo anterior, durante los últimos años se ha intensificado la búsqueda de métodos de estudio para detectar los impactos sobre los ecosistemas acuáticos, con motivo de poder diseñar e implementar medidas preventivas. En este caso, el uso y desarrollo de biomarcadores han cobrado un interés creciente para evaluar el riesgo en lo particular de una sustancia o mezcla química potencialmente tóxica, ya que los biomarcadores constituyen valiosos indicadores de presencia de sustancias exógenas o cambios biológicos ocurridos como respuestas a distintos xenobióticos (West *et al.* 2006, Borbón & González 2012).

En el campo de investigación referente a la ecotoxicología, los cambios biológicos expresados por los organismos, poblaciones o

comunidades sirven como señales de la posible alteración que está sufriendo un ecosistema debido principalmente, a las actividades de origen antropogénico. Cada nivel de respuesta biológica, representa una señal integrada de los niveles de contaminación en un área determinada y de esta forma, funciona como indicador del riesgo ecotoxicológico a que una población natural está siendo expuesta (Orrego *et al.* 2005, Öztürk *et al.* 2009).

A nivel del ecosistema acuático, los peces han sido muy utilizados en los protocolos de evaluación toxicológico, además de ser considerados especies centinelas, debido a que ellos se ubican en la cumbre de la cadena trófica y por tanto, pueden afectar la salud humana y aumentar su importancia para los estudios ambientales (Gutleb *et al.* 2002, Zhou *et al.* 2008, Nwani *et al.* 2010).

Si bien es cierto que es necesario considerar para evaluar impactos antropogénicos sobre los sistemas acuáticos, la utilización de organismos biomodelos (Mancera-Rodríguez *et al.* 2006, Salazar-Lugo 2009), es relevante de igual forma considerar que los organismos desarrollados en ambientes naturales de los ecosistemas, pueden actuar en condiciones controladas de variables como modelos biológicos experimentales, aun cuando no sean reconocidos por las agencias internacionales reguladoras como biomodelos (Borbón & González 2012). Tal es el caso de la especie *Gambusia punctata* Poey, 1854, un pez de la familia Poeciliidae que ha sido utilizado en varios estudios ecotoxicológicos (Argota *et al.* 2012a,b, 2013).

Finalmente, resulta relevante considerar que en los últimos años, una de las razones científicas de los programas de monitoreo o vigilancia ambiental, es que han estado diseñados bajo la consideración de utilizar organismos naturales en su condición de bioindicadores o biomonitores, siendo estos últimos los que ofrecen mayor ventaja para la

toma de decisiones ambientales (Borbón & González 2012).

El objetivo del presente trabajo fue realizar una evaluación ecotoxicológica histórica del ecosistema San Juan de Santiago de Cuba, Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Objeto de la investigación y época de muestreo. El estudio se realizó en el río principal San Juan ubicado en la ciudad de Santiago de Cuba, Cuba. Este río representa el más importante de la ciudad, encontrándose como parte de su cuenca hidrográfica, pozos de agua que son utilizados para el abastecimiento potable por la población. Fue considerado un monitoreo ambiental sistemático, el cual transcurrió desde noviembre de 2010 a noviembre de 2013, siendo realizado con una frecuencia trimestral dada las fluctuaciones de los parámetros físico-químicos de calidad del agua que se efectúa entre los períodos de lluvia y poca lluvia. Se establecieron seis estaciones de muestreo, teniendo como principal criterio de selección su estado de convergencia tributaria o zona de mezcla.

Parámetros físico-químicos. Como parámetros físico-químicos de calidad ambiental de las aguas se analizaron los valores de conductividad eléctrica (CE: $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$), alcalinidad total (AT: $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), dureza total (DT: $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), pH, sólidos totales (ST: $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), oxígeno disuelto (OD: $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), demanda bioquímica de oxígeno ($\text{DBO}_{5,20}$: $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y demanda química de oxígeno (DQO: $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). La $\text{DBO}_{5,20}$ fue realizada por el método del respirómetro de Warburg, mientras que la DQO fue determinada, según el método del dicromato empleándose Kits provenientes de HYDROCHEC/WPA. El resto de los parámetros fueron medidos *in situ*, mediante el analizador multiparamétrico HI 98.28 (HANNA). La CE, AT, DT y ST se evaluaron

de acuerdo a lo establecido por la Norma Cubana: NC. 1985 – Higiene Comunal. Agua Potable. Requisitos Sanitarios y Muestras. En el caso del pH, OD, DBO_{5,20} y DQO se utilizó la Norma Cubana: NC. 1999 – Evaluación de los Objetos Hídricos de Uso Pesquero. Con todos los parámetros se realizó una predicción de riesgo y para ello fue utilizado el programa GECOTOX (CENDA 2007 - 2012).

Metales. Los metales evaluados fueron Cu, Zn, Pb y Cd, los cuales se determinaron en cerebro, hígado y branquias de *G. punctata*, en hembras y machos, donde fueron seleccionados dos intervalos de clases según las longitudes 2,1 – 3,0 cm y 3,1 – 4,0 cm, respectivamente. Para la extracción de los órganos, la especie fue colocada en posición dorsal extrayéndosele las branquias como el hígado. Los órganos una vez extraídos fueron tratados individualmente en forma de compósito y colocados en estufa a 70°C durante 48 h para su secado total (Argota *et al.* 2013). Las muestras de cada órgano fueron trituradas y homogenizadas utilizando un mortero de ágata (USEPA 2000). Para el análisis se pesó en balanza analítica 0,5 g de las muestras, colocándose las mismas en vasos de precipitados (250 mL). Luego se adicionaron cinco mL de una mezcla de ácidos HClO₄:H₂SO₄ (7:1) y 15 mL de HNO₃ concentrado y la digestión se efectuó en una

plancha de calentamiento a 80°C hasta la evaporación total de la mezcla de ácidos. Se añadió nuevamente 5 mL de HNO₃ concentrado y se calentó hasta la aparición de sales húmedas. Finalmente se trasvasó, cuantitativamente a un frasco volumétrico de 25 mL con ayuda de una disolución de ácido nítrico 0,7 M determinándose los contenidos de metales mediante espectroscopía por plasma inductivamente acoplado con vista axial (ICP-AES), según las condiciones reportadas en la tabla 1. Las concentraciones de metales determinadas en la especie, fueron comparadas con las reportadas por Argota *et al.* (2013) para la misma especie, pero perteneciente al río Filé en la propia provincia de Santiago de Cuba, el cual fue utilizado como referencia ambiental.

Biomarcadores. Como biomarcadores de efecto se analizaron en individuos adultos, tanto niveles de proteínas totales como actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en *G. punctulata*. Para la determinación de niveles de proteínas totales se pesaron 0,5 g de tejido muscular en forma de compósito, luego se homogenizó con 1 mL de solución de Tris buffer pH = 7 y se centrifugó a 5 600 rpm durante 30 min a 5,5 °C en una centrífuga refrigerada. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se tomaron alícuotas de 10 µl a las que se adicionaron 5 mL

Tabla 1. Parámetros y condiciones instrumentales para la determinación de metales en órganos diana en adultos de *Gambusia punctulata* del río San Juan de Santiago de Cuba, Cuba.

Parámetros	Condiciones
Tipo de nebulizador	Meinhard (concéntrico)
Frecuencia	27 MHz
Energía del plasma	1,4 KW
Velocidad de flujo del gas formador del plasma	18,8 L/min
Preflujo	2 mL/min
Velocidad de bombeo	15 rpm
Tiempo de integración	3 seg
Ranura de entrada	25 µm
Graticula	2400 líneas /min

del reactivo de Bradford, después de agitar y reposar durante 5 min se registró, la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro Beckman®. Los resultados se expresan en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ por 0,5 g de tejido muscular. Durante el análisis de la AChE, las muestras de cerebro fueron homogeneizadas en tampón Tris-HCl 0,1M, Triton 0,1%, pH 8 en la proporción de 1 mL por 0,5 g de tejido y luego centrifugado a 1000 rpm durante 12 min. Para la actividad de AChE cerebral se utilizó acetiltiocolina yodada como sustrato y la detección de la liberación de tiocolina por reacción con 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico). Después de 5 min fue registrada la actividad mediante un espectrofotómetro (Perkin-Elmer UV/VIS) a 410 nm. La actividad se expresó como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de tejido y se realizaron todos los análisis por duplicado.

Bioética. La eutanasia para la especie *G. punctulata* consistió en preparar bolsas esterilizadas con hielo, las cuales se depositaron en recipientes de cristal con agua tratada, procurando que durante la inmersión de los ejemplares, éstos fueran tranquilizados

por hipotermia inmediata e inhibiéndose toda función biológica que permita finalmente, realizar la disección.

Análisis de datos. Para el análisis de los parámetros físico-químicos, metales pesados del río (San Juan y Filé), longitud (2,1 -3,0 cm y 3,1 – 4,0 cm), metales pesados (Cd, Zn, Pb y Cd) y en órganos diana de *G. punctulata* se utilizó el programa estadístico Statgraphis Plus 5.1 (Copyright 1994 – 2001). La comparación estuvo referida a un ANOVA. Las diferencias mediante Duncan fueron consideradas significativas a un valor de $P = 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 2, muestra los valores de los parámetros físico-químicos durante los períodos de lluvia y poca lluvia correspondientes a los años 2010 al 2013, donde se encontró en general, diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,05$), entre los períodos, tanto para el mismo año como los diferentes años (Tabla 3).

Tabla 2. Valores promedios de parámetros físico – químicos de calidad de agua del río San Juan de Santiago de Cuba, Cuba. (*) Referencia - Norma Cubana.

Parámetros	Años							
	2010		2011		2012		2013	
	Lluvia	Poca Lluvia						
CE	140,4	162,7	130,2	155,6	129,5	155,8	143,3	166,1
* 500								
AT	210	240	160	180	200	220	200	220
* 100								
DT	260	320	220	280	240	300	270	320
* 200								
pH	7,2	7,6	6,8	7,1	6,9	7,4	7,1	6,8
* 6,5-8,5								
ST	540,23	612,45	554,36	630,33	590,12	675,39	580,17	642,21
* 500								
OD	4,2	3,8	4,6	3,9	4,0	3,4	4,9	4,1
* 5,0								
DBO ₅	17,3	22,4	31,8	42,5	36,3	44,6	29,7	38,2
* 3,0								
DQO	216	320	246	315	317	369	311	376
* 15,0								

Puede expresarse que como parámetros de calidad de agua se entiende, lo que es propio de la composición de los cuerpos receptores quedando englobados dentro de sí, los parámetros físico-químicos, siempre que éstos se encuentren dentro de los rangos establecidos y por ende, libre de influencia antropogénica. La determinación de estos parámetros se realizó en general para tener un criterio evaluativo de la calidad de los cuerpos de agua, independientemente del tipo de uso.

El monitoreo de las fluctuaciones de parámetros los físico-químicos indican en cuanto un cuerpo de agua receptor que está siendo perturbado, por lo que las determinaciones realizadas en este estudio generalmente superaron el valor establecido según la norma Cubana utilizada. Es importante mencionar que los residuales sin tratamientos o de tipo parciales que se vierten hacia los cuerpos receptores como las aguas superficiales de los ríos, representa sin duda alguna, una de las mayores preocupaciones ambientales. Considerando que el volumen o masa residual que se genera no es sinónimo de toxicidad generada con efectos reversibles e irreversibles, es que en el programa GECOTOX se estima, uno de los riesgos asociados a la carga contaminante tributaria, la cual está referida al efecto ambiental que se produce, estando dentro de ello la variación de los parámetros físico-químicos en el tiempo.

En este estudio fue calculado un promedio con todos los parámetros físico-químicos medidos durante los años de evaluación, siendo éstos introducidos en el programa GECOTOX, el cual indicó (flecha) que la predicción de riesgo ambiental referido a la calidad de las aguas del ecosistema San Juan, es alto (Figura 1). La Tabla 4 muestra los valores promedios históricos desde el año 2010 hasta el 2013 para cada una de las combinaciones estudiadas, siendo los mismos comparados con los del ecosistema Filé. El factor longitud está expresado en cm y los contenidos de los

metales se registran en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Cuando no se detecta (ND) la señal analítica de un elemento, se asume para el cálculo el valor de su límite de detección.

La aplicación del análisis de varianza factorial a los resultados de la Tabla 4, permitió identificar los factores que influyeron significativamente en la bioacumulación de los cuatro metales estudiados (Tabla 5).

En la Tabla 5 se presentan los resultados de este cálculo y en la última columna aparecen los valores experimentales de probabilidad evaluados en la distribución F. Como se aprecia, los factores longitud y sexo del pez no influyen significativamente en la bioacumulación de ninguno de los metales estudiados ($p > 0,05$), indicando que estas características no son relevantes para evaluar el comportamiento de estos elementos tóxicos en este ecosistema (Zhou *et al.* 2008, Ramírez *et al.* 2008).

Es importante destacar que la longitud del pez es un indicador de crecimiento que está favorecida por la disponibilidad alimentaria en el medio, encontrándose entre ellos elementos minerales esenciales como Cu y Zn para el metabolismo (Ramírez *et al.* 2008).

En aquellas circunstancias donde exista una exposición a elementos no esenciales (Pb y Cd), éstos pueden ser acumulados igualmente por diferentes mecanismos biológicos como expresión de tolerancia a la adaptación (Marcussen *et al.* 2007). Por cuanto, la no existencia de diferencias significativas en las concentraciones entre los intervalos de longitud, debió estar dado a que aun cuando biológicamente los niveles de metales vayan aumentando en los tejidos de los órganos seleccionados, la acumulación siempre será proporcional a la longitud, pudiendo estar justificado por la mayor expresión cinética de la tasa metabólica de ingreso con relación a la menor cinética de excreción, trayendo consigo

retención de los elementos, siempre que la exposición a los mismos en el medio sea persistente (Jeziarska & Witeska 2006).

En el caso del sexo, la no diferencia significativa entre ellos, pudo estar dado simplemente porque la exposición a los elementos metálicos es la misma para ambos

sexos (Licata *et al.* 2005). Los factores río y órgano presentaron diferencias significativas para todos los elementos estudiados ($p < 0,05$). Las magnitudes individuales de estas diferencias se evaluaron aplicando la prueba de intervalos múltiples de Duncan (Montgomery 2004) (Tabla 6).

Tabla 3. Análisis de varianza de los parámetros físico-químicos por época y año del río San Juan de Santiago de Cuba, Cuba. SC = suma de cuadrados. gl = grados de libertad. F = Estadístico de Fisher del ANOVA. P- valor = valor de probabilidad.

parámetros F-Q	SC total	gl total	F	p - valor	época	año	grupos homogéneos																	
CE	4203,82	23	52,29	0,000	lluvia	2010	x																	
					poca lluvia	2010		x																
					lluvia	2011			x															
					poca lluvia	2011				x														
					lluvia	2012					x													
					poca lluvia	2012						x												
					lluvia	2013							x											
AT	14061,6	23	362,95	0,000	poca lluvia	2013													x					
					lluvia	2010	x																x	
					poca lluvia	2010		x																
					lluvia	2011			x															
					poca lluvia	2011				x														
					lluvia	2012					x													
					poca lluvia	2012						x												
DT	27578,5	23	3937,50	0,000	lluvia	2013														x				
					lluvia	2010	x																	
					poca lluvia	2010		x																
					lluvia	2011			x															
					poca lluvia	2011				x														
					lluvia	2012					X													
					poca lluvia	2012						x												
pH	1,6	23	20,57	0,000	lluvia	2013														x				
					poca lluvia	2013																x		
					lluvia	2010	x																	
					poca lluvia	2010		x																
					lluvia	2011	x																	
					poca lluvia	2011		x																
					lluvia	2012			x															
ST	43824,2	23	943,95	0,000	poca lluvia	2012																		
					lluvia	2013			x															
					lluvia	2010	x																	
					poca lluvia	2010		x																
					lluvia	2011			x															
					poca lluvia	2011				x														
					lluvia	2012					x													
OD	4,705	23	64,93	0,000	poca lluvia	2012																		
					lluvia	2013																		
					lluvia	2010	x																	
					poca lluvia	2010		x																
					lluvia	2011			x															
					poca lluvia	2011				x														
					lluvia	2011					x													

Continúa tabla 3.

Tabla 4. Valores promedios históricos de los metales del río San Juan de Santiago de Cuba, y Filé (referencia ambiental), Cuba. ND = No detectó. Longitud en cm.

Exp	factores influyentes				variable respuesta (mg·kg ⁻¹)			
	río	longitud	sexo	órgano	Cu	Zn	Pb	Cd
1	San Juan	2,1 – 3,0	Machos	Cerebro	ND	ND	ND	ND
2	San Juan	2,1 – 3,0	Machos	Hígado	42,29	79,19	ND	ND
3	San Juan	2,1 – 3,0	Machos	Branquia	48,20	50,66	0,026	18,51
4	San Juan	2,1 – 3,0	Hembras	Cerebro	ND	ND	ND	ND
5	San Juan	2,1 – 3,0	Hembras	Hígado	44,57	80,46	ND	ND
6	San Juan	2,1 – 3,0	Hembras	Branquia	49,22	51,76	0,035	19,69
7	San Juan	3,1 – 4,0	Machos	Cerebro	ND	ND	ND	ND
8	San Juan	3,1 – 4,0	Machos	Hígado	42,79	78,42	ND	ND
9	San Juan	3,1 – 4,0	Machos	Branquia	47,19	51,71	0,029	18,72
10	San Juan	3,1 – 4,0	Hembras	Cerebro	ND	ND	ND	ND
11	San Juan	3,1 – 4,0	Hembras	Hígado	46,71	79,51	ND	ND
12	San Juan	3,1 – 4,0	Hembras	Branquia	51,15	52,38	0,039	19,77
13	Filé	2,1 – 3,0	Machos	Cerebro	ND	ND	ND	ND
14	Filé	2,1 – 3,0	Machos	Hígado	24,2	53,21	ND	ND
15	Filé	2,1 – 3,0	Machos	Branquia	31,2	44,18	0,010	12,32
16	Filé	2,1 – 3,0	Hembras	Cerebro	ND	ND	ND	ND
17	Filé	2,1 – 3,0	Hembras	Hígado	25,8	55,30	ND	ND
18	Filé	2,1 – 3,0	Hembras	Branquia	31,9	44,21	0,012	12,58
19	Filé	3,1 – 4,0	Machos	Cerebro	ND	ND	ND	ND
20	Filé	3,1 – 4,0	Machos	Hígado	24,6	52,22	ND	ND
21	Filé	3,1 – 4,0	Machos	Branquia	30,7	44,20	0,013	12,12
22	Filé	3,1 – 4,0	Hembras	Cerebro	ND	ND	ND	ND
23	Filé	3,1 – 4,0	Hembras	Hígado	23,83	53,72	ND	ND
24	Filé	3,1 – 4,0	Hembras	Branquia	32,0	44,22	0,012	12,55

Todas las concentraciones medias de los elementos metálicos fueron mayores en el ecosistema San Juan comparados con Filé, encontrándose diferencias significativas entre los mismos (Tabla 5). Este comportamiento es debido a que los factores de tensión relacionados con el vertimiento de las fuentes tributarias, es mayor en el río San Juan. Por lo tanto el ecosistema Filé puede ser utilizado como referencia ambiental.

Si se comparan los valores de la Tabla 6 con los límites de detección (casillas en negrita), puede mencionarse que en las branquias se bioacumulaban todos los elementos

estudiados, mientras que en el hígado solo se acumularon Cu y Zn.

Las concentraciones medias de los elementos detectadas en cerebro e hígado como Pb y Cd fueron bien bajas, lo cual coincidieron con los límites de detección del método analítico empleado. Lo anterior se justifica, porque las branquias son los órganos que permiten desde la columna de agua, la entrada al igual que el oxígeno de elementos esenciales como el Cu y Zn, la cual representa la matriz ambiental de mayor presencia de metales (Alquezar 2005, Nwani *et al.* 2010).

Tabla 5. Análisis de varianza factorial para los metales estudiados del río San Juan de Santiago de Cuba, Cuba. SC = suma de cuadrados. gl = grados de libertad. F = Estadístico de Fisher del ANOVA. P-valor = valor de probabilidad.

metal	f fuente de variación	SC	gl	cuadrado medio	F	p-valor
Cu	río	911	1	911	34,5	0,00
	longitud	0,105	1	0,11	0,00	0,95
	sexo	8,18	1	8,18	0,31	0,58
	órgano	7539	2	3769	143	0,00
	residual	475	18	26,4		
	total	8934	23			
Zn	río	735	1	735	18,6	0,00
	longitud	0,28	1	0,28	0,01	0,93
	sexo	2,52	1	2,52	0,06	0,80
	órgano	18825	2	9413	239	0,00
	residual	710	18	39,5		
	total	20274	23			
Pb	río	280×10^{-6}	1	280×10^{-6}	7,79	0,01
	longitud	$4,17 \times 10^{-6}$	1	$4,17 \times 10^{-6}$	0,12	0,74
	sexo	$16,7 \times 10^{-6}$	1	$16,7 \times 10^{-6}$	0,46	0,50
	órgano	1045×10^{-6}	2	522×10^{-6}	15,5	0,00
	residual	647×10^{-6}	18	$35,9 \times 10^{-6}$		
	total	1993×10^{-6}	23			
Cd	río	30,6	1	30,6	8,85	0,01
	longitud	$1,5 \times 10^{-4}$	1	$1,5 \times 10^{-4}$	0,00	0,99
	sexo	0,36	1	0,36	0,10	0,75
	órgano	1327	2	664	192	0,00
	residual	62,3	18	3,46		
	total	1421	23			

Tabla 6. Prueba de Duncan para las diferencias significativas ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) del río San Juan de Santiago de Cuba, Cuba. Los asteriscos indican el número de grupos con diferencias estadísticas significativas. Las casillas de resultados en negrita coinciden con los límites de detección del método analítico.

metal	río		Órgano diana		
	San Juan	Filé	cerebro	hígado	branquia
Cu	31,0 **	18,7 *	0,016 *	34,3 **	40,2 ***
Zn	43,7 **	32,6 *	0,020 *	66,5 ***	47,9 **
Pb	0,016 **	0,009 *	0,008 *	0,008 *	0,022 **
Cd	6,40 **	4,14 *	0,007 *	0,007 *	15,8 **

De forma similar ocurre el ingreso permanente de otros elementos como Pb y Cd, que aunque no tienen una función biológica definida, pueden ser retenidos por las branquias, siendo entonces este órgano un blanco inicial de toxicidad por exposición a metales (Jeziarska & Witeska 2006, Öztürk *et al.* 2009, Nwani *et al.* 2010). Asimismo, una vez que el Cu y Zn son absorbidos por las branquias, éstos son transportados al torrente sanguíneo hasta llegar al hígado, ya que el Cu interviene en el metabolismo del tejido conectivo, desarrollo óseo y función nerviosa, mientras que el Zn juega un papel importante en la regulación de

la homeostasia (Widianarko *et al.* 2000). Esto justifica la presencia de ambos elementos en este órgano y la ausencia de Pb y Cd, donde además se observó que en el cerebro no ocurrió acumulación de los metales. Sin embargo, otros autores han encontrado un incremento en la acumulación de metales en el cerebro (Jeziarska & Witeska 2006).

La Tabla 7 muestra los niveles promedio de proteínas totales, donde fueron mayores en las hembras que los machos de forma significativa ($P < 0,05$), así como fue comportándose de forma ascendente del 2010 al 2013.

Tabla 7. Niveles promedio de proteínas totales ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ por 0,5 g de tejido muscular) por sexo de *Gambusia punctata* y año de muestreo del río San Juan de Santiago de Cuba, Cuba. Letras a y b, indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). DE = desviación estándar.

año	media \pm DE	
	macho	hembra
2010	8,56 \pm 2,91 ^a	10,48 \pm 2,56 ^b
2011	13,20 \pm 3,29 ^a	15,22 \pm 3,80 ^b
2012	16,56 \pm 2,08 ^a	17,87 \pm 2,69 ^b
2013	18,91 \pm 2,18 ^a	19,94 \pm 2,12 ^b

Según Álvarez (2008), en ambientes naturales cuando las concentraciones de los metales se incrementan en los tejidos, ocurre un aumento en la concentración de proteínas, pudiendo encontrarse entre ellas las metalotianinas que son de baja masa molecular, ricas en cisteína y responsables además del transporte de metales, ya sean esenciales o no. Parece ser, que los niveles de proteínas fueron aumentando como respuesta o mecanismo de control directamente proporcional al aumento de metales pesados en los tejidos biológicos fundamentalmente en branquias e hígado. Yacoub & Gad (2012) y Habib & Samah (2013) han encontrado una disminución en la

concentración de los niveles de proteínas en peces con el aumento de la concentración de metales en los tejidos, posiblemente debido a la disminución de los niveles de insulina, al tener esta molécula un profundo efecto en la ruta proteogénica.

La tabla 8 muestra la actividad promedio de la enzima acetilcolinesterasa en los ejemplares agrupados en forma de compuesto, donde igualmente fueron mayores para las hembras, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) y en forma ascendente entre los años 2010 al 2013.

Tabla 8. Actividad promedio de la acetilcolinesterasa (AChE) (umol/min/mg de tejido) por sexo de *Gambusia punctata* y año de muestreo del río San Juan de Santiago de Cuba, Cuba. Las letras a y b, indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). DE = desviación estándar.

año	media \pm DE	
	macho	hembra
2010	411,32 \pm 18,71 ^a	448,53 \pm 25,38 ^b
2011	439,23 \pm 21,19 ^a	471,26 \pm 34,27 ^b
2012	476,43 \pm 31,13 ^a	503,21 \pm 44,25 ^b
2013	519,60 \pm 36,58 ^a	534,38 \pm 31,44 ^b

Meshorer & Soreq (2006) mencionan que AChE en la mayoría de los estudios se ha enfocado a su actividad en la hidrólisis de la ACh, con potencial en monitoreo ambiental (Borbón & González 2012), aunque expresa que esta enzima no está restringida solo al sistema nervioso y parece tener diferentes funciones, debido a que está presente tanto en bacterias como plantas y en las que se piensa puede funcionar como un factor trófico. Esto afirmación pudiera explicar como de un año a otro esta enzima ha ido aumentando, sin encontrarse niveles significativos en el cerebro de metales pesados, en lo particular Pb y Cd. Meshorer & Soreq (2006) indican que las proteínas con dominio de colinesterasas parecen ser el resultado de duplicaciones de un gen ancestral de AChE dado que la comparación de la secuencia del dominio catalítico y del no catalítico sugiere que en estos genes la actividad enzimática pudo perderse en varias etapas independientes durante la evolución.

Finalmente, según Nunes *et al.* (2005), al evaluar y estimar los efectos antropogénicos que se generan sobre el ecosistema acuático indican que es una tarea compleja (Rizzo *et al.* 2010). Debido a esto, han sido propuestos un gran número de bioindicadores y pruebas a organismos para la evaluación ecotoxicológica en ambientes acuáticos, lo cual justificó poder utilizar una vez más a la especie *G. punctata*, ya que según Van der Oost *et al.* (2003) como pez, responde a los factores de estrés ambiental

por medio de una variedad de mecanismos compensatorios, teniendo gran importancia en los estudios sobre biomonitorización de los sistemas acuáticos.

Se concluyó en este trabajo, que la evaluación ambiental histórica indicó una fluctuación de parámetros físico - químicos en la calidad de las aguas, donde el programa GECOTOX evidenció según los valores e interacción entre los parámetros un riesgo. Los niveles de metales indicaron que están siendo biodisponibles, corroborándose tal comportamiento a través de los biomarcadores de efectos como proteínas totales y actividad de la enzima AChE. Dado en general, que de un año a otro todas las respuestas fueron ascendentes, puede señalarse que el ecosistema San Juan, presentó efectos ecotoxicológicos en el tiempo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alquezar, R.; Booth, S. & Booth, D. 2005. Metal accumulation in the smooth toadfish, *Tetractenos glaber*, in estuaries around Sydney, Australia. *Environmental Pollution*, 142: 123-131.
- Alvarez, L.T.; Mendoza, C.D.; Moreno, S.R. & Gold, B.G. 2008. Thiol peptides induction in the seagrass *Thalassia testudinum* (Banks ex König) in response to cadmium exposure. *Aquatic*

- Toxicology, 86:12-19.
- Argota, P.G.; González, P.Y.; Argota, C.H.; Fimia, D.R. & Iannacone, O.J. 2012a. Desarrollo y bioacumulación de metales pesados en *Gambusia punctata* (Poeciliidae) ante los efectos de la contaminación acuática. Revista electrónica veterinaria, 13: 05B en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>_Leído el 16 de septiembre del 2013.
- Argota, P.G.; Argota, C.H.; Larramendi, G.D.; Mora, T.Y.; Fimia, D.R. & Iannacone, O.J. 2012b. Histología y química umbral de metales pesados en hígado, branquias y cerebro de *Gambusia punctata* (Poeciliidae) del río Filé de Santiago de Cuba. Revista electrónica veterinaria, 13, 05B en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>_Leído el 16 de septiembre del 2013.
- Argota, P.G.; Argota, C.H.; Rodríguez A.J. & Fernández, H.A. 2013. Determinación de Cu, Zn, Pb y Cd por espectrometría de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado en órganos de la especie *Gambusia punctata* (Poeciliidae). Revista Cubana de Química, 25: 92-99.
- Borbón, J.F. & González, M.J.M. 2012. Exposición aguda a fentión en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*): efectos tóxicos, cambios en actividad colinesterasa y uso potencial en monitoreo ambiental. Revista Ciencias Salud, 10 (Especial): 43-51.
- CENDA (Centro Nacional de Derecho de Autor). 2007-2012. Programa GECOTOX: Analizador multifuncional de riesgo ecotoxicológico para residuales ambientales. República de Cuba.
- Gutleb, A.C.; Helsberg, A. & Mitchell, C. 2002. Heavy metal concentration in fish from a pristine rainforest valley in Peru: A baseline study before the start of oil-drilling activities. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 69: 523-529.
- Habib, S.A. & Samah, A.M.A.S. 2013. Effect of heavy metals pollution on protein biosynthesis in catfish. Journal of Water Resource and Protection, 5: 555-562.
- Jeziarska, B. & Witeska, M. 2006. The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters. In: Soil and Water pollution monitoring, Protection and Remediation. Twardowska, I. Allen, H.E.; Häggblom, M.M. & Stefaniak, S. (Eds.). pp. 3-23. Springer. Krakow. 629 p.
- Lakshmanan, R.; Kesavan, K.; Vijayanand, P.; Rajaram, V. & Rajagopal, S. 2009. Heavy metals accumulation in five commercially important fishes of Parangipettai, Southeast coast of India. Advance Journal of Food Science and Technology, 1: 63-65.
- Licata, P.; Trombetta, D.; Cristiani, M.; Martino, D.; Caló, M. & Naccari, R. 2005. Heavy metals in liver and muscle of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) caught in the straits of Messina (Sicily, Italy). Environmental Monitoring and Assessment, 107: 239-248.
- Mancera-Rodríguez, N.J. & Álvarez-León, R. 2006. Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia. Acta Biológica Colombiana, 11: 3-23.
- Marcussen, H.; Holm, P.E.; Ha, L.T. & Dalsgaard, A. 2007. Food safety aspects of toxic element accumulation in fish from wastewater-fed ponds in Hanoi, Vietnam. Tropical Medicine and International Health, 11: 34-39.
- Meshorer, E. & Soreq, H. 2006. Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. Trends in Neurosciences, 29:216-224.
- Mongomery, D.C. 2004. *Diseño y Análisis de Experimentos*. 3^{ra} Ed. Editorial Félix Varela. La Habana.

- Nwani, C.D.; Nwachi, D.A.; Okogwu, O.I.; Ude, E.F. & Odoh, G.E. 2010. Heavy metals in fish species from lotic freshwater ecosystem at Afikpo, Nigeria. *Journal of Environmental Biology*, 31: 595-601.
- Nunes, B.; Carvalho, F. & Guilhermino, L. 2005. Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61: 413-419.
- Orrego, R.; Moraga, C.G.; González, M.; Barra, R.; Valenzuela, A.; Burgos, A. & Gavilán, J.F. 2005. Reproductive, physiological, and biochemical responses in juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sediment from pulp and paper mill industrial discharge areas. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1935-1943.
- Öztürk, M.; Özözen, G.; Minareci, O. & Minareci, E. 2009. Determination of heavy metals in fish, water and sediments of Avsar Dam lake in Turkey. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 6: 73-80.
- Ramírez, M.A.P.; León, M.M.L. & Piñeiro, P.S. 2008. Metales pesados en trucha (*Micropterus salmoides floridanus*) de la presa Habanilla, Cuba. *Revista AquaTIC*, 29: 1-9.
- Rizzo, A.; Daga, R.; Arcagni, M.; Perez, C.S.; Bubach, D.; Sánchez, R.; Ribeiro, G. S. & Arribére, M.A. 2010. Concentración de metales pesados en distintos compartimientos ambientales de lagos andinos de Patagonia Norte. *Ecología Austral*, 20: 155-171.
- Safahieh, A.; Monikh, F.A.; Savari, A. & Doraghi, A. 2011. Heavy metals concentration in Mullet fish, *Liza abu* from petrochemical waste receiving creeks, Musa Estuary (Persian Gulf). *Journal of Environmental Protection*, 2: 1218-1226.
- Salazar-Lugo, R. 2009. Estado del conocimiento de las concentraciones de cadmio, mercurio y plomo en organismos acuáticos de Venezuela. *Revista electrónica de Veterinaria*, 10: en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/> Leído el 16 de septiembre del 2013.
- Statgraphics Plus. 1994-2001. Version 5.1. Software. Copyright for Statistical Graphics Corporation.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 2000. *Guidance for assessing chemical contaminant data for use in fish advisories*. Vol 1. *Fish Sampling and Analysis*. Third Ed. Disponible en <http://www.epa.gov> leído el 15 de agosto del 2013.
- Van der Oost, R.; Beyer, J. & Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13: 57-149.
- West, D.W.; Ling, N.; Hicks, B.J.; Tremblay, L.A.; Kim, N.D. & Van den Heuvel, M.R. 2006. Cumulative impacts assessment along a large river, using brown bullhead catfish (*Ameiurus nebulosus*) populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 1868-1880.
- Widianarko, B.; Van Gestel, C.A.M.; Verweij, R.A. & Van Straalen, N.M. 2000. Associations between trace metals in sediment, water and guppy, *Poecilia reticulata* (Peters), from urban streams of Semarang, Indonesia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46:101-107.
- Yacoub, A.M. & Gad, N.S. 2012. Accumulation of some heavy metals and biochemical alterations in muscles of *Oreochromis niloticus* from the river Nile in Upper Egypt. *International Journal of Environmental Science and Engineering*, 3: 1-10.
- Zhou, Q.; Zhang, J., Fu, J.; Shi, J. & Jiang, G.

2008. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*, 606:135-150.

Received October 16, 2013.
Accepted November 16, 2013.