



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

"TOXICIDAD AGUDA Y CRONICA DEL CADMIO
Y MERCURIO EN EL CLADOCERO *Alona rectangular*"

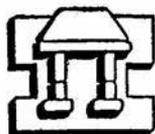
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ROSALIA KOROBOSHKI BRAND ARZAMENDI



IZTACALA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA NANDINI SARMA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Dra. Nandini Sarma por la dedicación en la dirección de este trabajo, así como por el apoyo brindado, su confianza y amistad.

Al Dr. S.S.S. Sarma por el apoyo brindado para la realización de la tesis.

A los revisores del escrito por el tiempo dedicado y por sus valiosas observaciones.

Índice.

| | |
|--|----|
| Resumen | 3 |
| Introducción | 4 |
| Antecedentes | 10 |
| Justificación | 14 |
| Objetivos | 15 |
| Diagrama de flujo | 17 |
| Materiales y Métodos | 18 |
| Resultados | 21 |
| * Concentración letal con cadmio | 26 |
| * Concentración letal con mercurio | 27 |
| * Crecimiento poblacional 0.5×10^6 células/ml | 28 |
| * Crecimiento poblacional 2×10^6 células/ml | 29 |
| * Densidad máxima (Total) con cadmio | 30 |
| * Densidad máxima (Total) con mercurio | 31 |
| * Día de densidad máxima (Total) con cadmio | 32 |
| * Día de densidad máxima (Total) con mercurio | 33 |
| * Tasa de crecimiento poblacional con cadmio | 34 |
| * Tasa de crecimiento poblacional con mercurio | 35 |
| Discusión | 36 |
| Conclusiones | 41 |
| Referencias | 42 |
| Anexo | |
| Tablas ANOVA | 46 |
| Medio de cultivo Bold Basal | 48 |

RESUMEN

Los sistemas acuáticos están en constante cambio a lo largo del tiempo, esto se debe a cambios naturales en el cuerpo de agua o bien por la contaminación antropogénica, provocando un desequilibrio en el sistema y alterando las comunidades acuáticas como el zooplancton. Conforme avanza la industrialización, aumenta la demanda de sustancias químicas, lo que ha generado una gran cantidad de contaminantes como los metales pesados, que no son degradados por tratamientos biológicos, ya que pueden permanecer en los sedimentos y ser liberados lentamente dentro de los cuerpos de agua (Persoone y Janssen, 1993).

Dentro del zooplancton, el grupo de los cladóceros ha sido objeto de muchos estudios toxicológicos, sobre todo los miembros pelágicos del género *Daphnia*, sin embargo actualmente no existen trabajos con el cladóceros *Alona rectangula*, el cuál es un organismo litoral, por ello, en este estudio se abordaron ensayos de toxicidad aguda y crónica bajo el efecto de diferentes concentraciones de cadmio y mercurio con diferentes concentraciones de alimento (alta y baja). Para el metal pesado cadmio las concentraciones probadas fueron: 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.105 y 0.21 mg/L⁻¹ y para el mercurio de: 0.00033, 0.00066, 0.0013, 0.0026, 0.0053 y 0.0107 mg/L⁻¹. Se analizaron los efectos sobre el crecimiento poblacional, máxima densidad y el tiempo en que esta se alcanza, así como la tasa de crecimiento por día bajo diferentes densidades de alimento con *Chlorella vulgaris* en concentraciones de: 0.5 y 2 x 10⁶ céls/ml⁻¹.

Los resultados mostraron que el mercurio es ochenta veces más tóxico que el cadmio. La tasa de crecimiento de *Alona* para el cadmio varió entre -0.72 y 0.22 ind/día⁻¹ bajo condiciones de baja concentración de alimento y para la alta fue entre -0.46 a 0.20 ind/día⁻¹. Para el mercurio bajo las mismas condiciones de alimentación, los valores fueron -0.12 a 0.12 ind/día⁻¹ y -0.66 y 0.008 ind/día⁻¹ respectivamente. A los cladóceros que se les administró cadmio con una mayor densidad de *Chlorella*, presentaron crecimientos poblacionales significativamente mayores que aquellos expuestos a una menor densidad de alimento. Sin embargo a los que se les administró mercurio presentaron un doble efecto negativo tóxico-alimenticio debido a la gran toxicidad que presenta el metal pesado antes mencionado. Con este estudio podemos concluir que *Alona rectangula* puede ser utilizado como un buen indicador biológico, debido a que su forma de vida le permite estar en contacto con los contaminantes depositados en las paredes y piso del cuerpo de agua, por lo que se sugiere realizar más pruebas de toxicidad aguda y crónica con diferentes organismos litorales y no sólo con pelágicos.

INTRODUCCIÓN

A partir de las últimas décadas, se han generado grandes núcleos de poblaciones y centros industriales que han afectado seriamente la calidad del medio debido al manejo y disposición inadecuada de una gran cantidad de desechos. Como consecuencia directa del vertido sin previo tratamiento de las aguas residuales, municipales, agrícolas e industriales se ha deteriorado la calidad de los diferentes cuerpos de agua. Los contaminantes vertidos a cuerpos de agua pueden provocar profundas modificaciones en los componentes físico-químicos y biológicos de los medios acuáticos receptores (Persoone y Janssen, 1993).

Desde la revolución industrial, los residuos generados por las actividades humanas son de naturaleza inorgánica. Conforme avanzó el proceso de industrialización en todo el mundo aumentó la demanda de sustancias químicas, lo que ha generado una gran cantidad de contaminantes como los pesticidas y otras sustancias tóxicas que pueden ser degradadas por tratamientos biológicos, pero los metales pesados, que no son degradados, pueden permanecer en los sedimentos y ser liberados lentamente dentro de los cuerpos de agua (Travieso, *et al.*, 1999), ocasionando problemas ecológicos al ser liberados al ambiente (Persoone y Janssen, 1993).

Actualmente, la República Mexicana es un país con una gran población, con grandes áreas urbanizadas e industrializadas que producen miles de toneladas de residuos generados por diversas industrias como: la papelera, alimenticia, química básica (orgánica e inorgánica), agroquímica, petroquímica, minería, fundición de chatarra, etc (Lozano, 1997). Algunas de estas industrias generan residuos que contienen metales pesados, entre ellos: plomo (Pb), mercurio (Hg), cromo (Cr), cobre (Cu) y cadmio (Cd); se sabe que el mercurio es el más tóxico, seguido por el cadmio. (Fargasova, 1994).

La emisión del mercurio y el cadmio al ambiente puede llevarse a cabo en dos formas: hacia la atmósfera o al océano, por vertidos naturales o antropogénicos. Cuando es a la atmósfera de manera natural es por la erupción de volcanes, vegetación, incendios forestales, entre otros; cuando es antropogénica se debe a la producción de metales primarios y secundarios no ferrosos, combustión de madera y fertilizantes de fosfatos etc.

MERCURIO- Es uno de los metales que se usan para fabricar una gran variedad de productos como: las baterías donde es usado en el ánodo, armas y blindaje, pigmentos (son utilizados para elaborar pinturas de plásticos), fabricación de armas, textiles, vasos, gomas de borrar, pinturas (los colores que van del amarillo al rojo, son producidos por una mezcla de sulfuro de cadmio y selenio de cadmio), esmaltes, barniz para cerámica, amalgamas dentales, tinta de imprenta, colores artísticos, plásticos y productos sintéticos (donde combinan los compuestos de cadmio y bario con ácidos orgánicos para estabilizar al plástico y que este sea más difícil de ser degradado) para aleaciones y otros usos. (Laws, *et al.*, 1993).

Todas las formas de mercurio son potencialmente tóxicas, pero el rango de toxicidad varía considerablemente, siendo el vapor de mercurio la forma más peligrosa, dado que puede difundirse a través de los pulmones hasta la sangre y luego hasta el cerebro, donde puede causar daños importantes. El mercurio puede sufrir modificaciones, probablemente la más grave de éstas, sea la transformación del mercurio metálico en metil- y dimetil, derivados por la acción de micro individuos anaeróbios, especialmente por, *Clostridium cochlearum* que se encuentra en los sedimentos acuáticos. También los ácidos nucleicos resultan afectados por los metales pesados. Éstos ocasionan un efecto genotóxico que puede ser catalogado en las siguientes categorías: mutaciones, aberraciones cromosómicas, alteraciones en la síntesis y reparación de ácidos nucleicos y transformaciones celulares (Vanegas, *et al.*, 1997).

CADMIO- Entre los metales pesados, el cadmio es un metal químicamente similar al zinc, con diferencia de que al zinc lo podemos encontrar en el cuerpo humano como un elemento esencial en pequeñas cantidades (Vanegas, *et al.*, 1997) y el cadmio es un metal pesado no esencial, el cuál al estar en contacto con los individuos es tóxico. Este se encuentra ampliamente distribuido en la litósfera, es usualmente encontrado en bajas concentraciones en la corteza terrestre en las rocas y suelo, con una concentración típica de 100-300 ppb y 200-800 ppb, respectivamente, aunque también hay concentraciones altas de cadmio en rocas fosfatadas.

El cadmio se emplea industrialmente como agente antifricción, antioxidante, en aleaciones, en la fabricación de semiconductores, baterías y en la manufactura de PVC.

El cadmio en el ambiente es peligroso porque muchas plantas y algunos animales lo absorben eficazmente y lo concentran dentro de sus tejidos. Una vez absorbido, se acopla con una proteína llamada metalotioneína que se acumula en los riñones, el hígado y los órganos reproductores.

Se estima que cerca de la mitad del cadmio es emitido de manera natural a la atmósfera y es depositado en los océanos, pero únicamente del 25 al 30% se ha encontrado emitido directamente en el mar y la atmósfera (Laws, *op. cit.*, 1993). El cadmio es uno de los metales que con mayor frecuencia se encuentra en ambientes acuáticos (Vanegas, *op. cit.*, 1997). Por ejemplo, en estudios realizados en el río Coatzacoalcos en México, se han encontrado niveles de cadmio de 2.06 a 2.74 mg/kg en sedimentos de la columna de agua que va de los 4 a 14m de profundidad (Rosales y Carranza, 1998). Se ha encontrado en sedimentos de agua no contaminada en concentraciones de 0.04 a 0.8 mg/kg, y en ríos contaminados con niveles de un rango de 30 a 400 mg/kg (Merian, 1991). Todos estos productos de desecho son tóxicos, en especial los metales pesados los cuales son desechados a los ambientes acuáticos produciendo un desequilibrio ecológico en la cadena trófica por lo que es importante su estudio.

La ecotoxicología es la ciencia que se encarga del estudio de los efectos de los contaminantes en el ambiente y su biota. La toxicología acuática es la parte de la ecotoxicología que se encarga del estudio de las sustancias y compuestos extraños presentes en los ecosistemas acuáticos y es por esto que ha recibido una mayor atención durante las últimas décadas, debido a los problemas de contaminación del agua tanto en los países industrializados como en los que están en vías de desarrollo (Baudó, 1987).

Algunos de los bioensayos ecotoxicológicos que actualmente se llevan a cabo son las pruebas agudas y crónicas (ciclos generacionales), que se realizan en comunidades de microcosmos y mesocosmos. En estas pruebas se mide el tiempo de respuesta de las comunidades ante un agente tóxico. Los efectos de dicho agente se dividen en: efectos a corto plazo (parte del período generacional del individuo) y efectos de larga duración (transgeneracionales) (Gama y colaboradores, 2001).

Los efectos de corta duración se abordan mediante las pruebas de toxicidad aguda, que se evalúan con la concentración letal media (CL₅₀), (en esta prueba se estima la concentración a la cual muere el 50% de la población experimental (CL₅₀)). Los efectos de larga duración se abordan mediante las pruebas de toxicidad crónica, que se evalúa en generaciones, demografía y ciclos de vida, que se definen por los efectos a largo plazo, y a su vez pueden estar relacionados con cambios en el apetito, metabolismo, mutaciones, reproducción, crecimiento y muerte (Gama y colaboradores, 2001).

También es importante mencionar que existen muchos individuos que pueden biomagnificar y bioacumular los metales pesados en altos niveles del tóxico, inhibiendo sus sistemas enzimáticos y afectando los procesos bioquímicos y fisiológicos (Atwell, *et al.*, 1998; González, *et al.*, 1998; Travieso, *et al.*, 1999). Cuando los niveles normales de metales pesados emitidos se exceden por actividades antropogénicas, existe un daño potencial hacia el hombre cuando consume alimentos contaminados provenientes del mar y de agua dulce (González, *op. cit.*, 1998).

Debido a la gran cantidad de actividades antropogénicas y a los daños que éstas provocan, en las últimas tres décadas el estudio de la ecotoxicología ha tomado gran interés y se han empleado ampliamente los organismos invertebrados en pruebas estándar debido a su gran sensibilidad a los tóxicos (Reynoldson, 1989).

Dichos organismos invertebrados, entre ellos los crustáceos y rotíferos, quienes realizan el pastoreo pelágico son los consumidores primarios más importantes (herbívoros) en la cadena alimenticia. En el pastoreo bentónico y en la cadena alimenticia del detritus, las larvas de insectos y crustáceos son funcionalmente los más importantes convertidores de la biomasa muerta, por lo que no es una sorpresa el uso de crustáceos (copépodos y cladóceros) y rotíferos para el desarrollo de varios métodos y pruebas ecológicas (Persoone y Jenssen, 1993).

Debido a que en este trabajo nos enfocamos al estudio del grupo de los Cladóceros es importante conocer su clasificación taxonómica (Negrea, *et al.*, 1999): Phylum- Arthropoda, Superclase- Crustacea, Clase- Branchiopoda, Superorden- Cladóceros, Orden- Anomopoda, Familia- Chydoridae, Género- *Alona*, Especie- *rectangula*.

Los cladóceros constituyen parte del plancton el cuál se divide en dos grupos: fitoplancton y zooplancton, este último es importante en la transmisión de energía acumulada por el fitoplancton, bacterias y detritus hacia otros niveles tróficos. El zooplancton está conformado por: los copépodos, rotíferos y cladóceros. Estos últimos son los individuos que con más frecuencia se utilizan para pruebas ecotoxicológicas (Maltby y Calow, 1989).

Con respecto a los cladóceros, son pequeños individuos transparentes de 0.2 a 4.0 mm aproximadamente. Son individuos ecológicamente muy importantes, debido a que ocupan gran cantidad de ambientes y se les puede encontrar desde el Ártico hasta latitudes tropicales, habitando principalmente ambientes dulceacuícolas como: embalses, lagos, lagunas y charcos temporales o efímeros (estos son ambientes lénticos de agua estancada de escasa extensión y de poca profundidad). También se les puede encontrar en mares e inclusive se han encontrado atrapados en agua de musgos que cuelgan de los árboles.

Son importantes en la cadena trófica debido a que forman el eslabón entre los productores primarios (fitoplancton) y los consumidores secundarios (planctívoros). Los cladóceros tienen una extensa dieta, pueden alimentarse con: bacterias, algas, protozoos, rotíferos, cladóceros y de otros pequeños crustáceos. Estos individuos se alimentan por filtración, como es el caso de los herbívoros, mientras que los individuos planctívoros atrapan a su presa y succionan sus fluidos corporales o bien pueden comer a su presa entera. La importancia de los cladóceros radica en su posición en la cadena alimenticia y sus relaciones energéticas en sistemas acuáticos, pues regulan la cantidad de algas contenidas en un cuerpo de agua debido a la gran eficiencia de sus mecanismos de filtración (Dodson y Frey, 1991). También son presas importantes para peces en estado juvenil y crustáceos (Martínez y Gutierrez, 1991). Los piscívoros se alimentan de los planctívoros, éstos de los herbívoros (cladóceros, rotíferos, copépodos), y a su vez, éstos consumen microalgas, que finalmente asimilan los nutrientes disueltos en el agua (Ruppert y Barnes, 1996). Es importante mencionar, que los cladóceros ocupan una posición importante como consumidores intermediarios en la cadena alimenticia bentónica de ecosistemas acuáticos y están íntimamente ligados con



U.N.A.M. FES
IZTACALA

los sedimentos, donde se han encontrado zonas de depósito de contaminantes. La formación de estos depósitos se debe a que existen muchos contaminantes insolubles en agua y se sabe que son adsorbidos por partículas suspendidas de materia orgánica, como consecuencia, muchos sedimentos contienen una gran cantidad de contaminantes de tipo orgánico y metálico (Reynoldson, *op. cit.*, 1989), con los que los cladóceros están en contacto.

IZT.

Los cladóceros son individuos partenogénéticos, su ciclo de vida es corto y alcanzan su madurez sexual rápidamente, por lo que su tasa de reproducción es alta (Dodson y Frey, 1991). Son organismos fáciles de cultivar en condiciones controladas en poco tiempo y espacio, tienen una amplia distribución, gran importancia ecológica y presentan gran sensibilidad a los químicos, por lo que son los individuos ideales para trabajar en laboratorio (Peters, 1987; Cañizares, 1999).

Actualmente existen varios trabajos sobre el cladóceros del género *Daphnia*, en los que es utilizado frecuentemente para bioensayos de toxicidad aguda y crónica, para cuantificar la toxicidad de efluentes de mezclas simples y compuestas, además de utilizarse como un indicador biológico (Cañizares, *op. cit.*, 1999).

El frecuente uso del género *Daphnia* se debe a que posee las siguientes características:

- Se distribuyen en una gran cantidad de cuerpos de agua dulce y están presentes en una amplia variedad de hábitats.
- Son un enlace importante en cadenas alimenticias acuáticas (ellos pastorean a los productores primarios y son alimento de muchas especies de peces).
- Tienen un ciclo de vida relativamente corto y son fáciles de cultivar en el laboratorio.
- Son sensibles a contaminantes acuáticos.
- Tienen un tamaño pequeño, requieren de pequeños volúmenes de agua y no requieren de espacios grandes (Persoone, *op. cit.*).

Actualmente se utilizan con gran frecuencia dos especies en trabajos ecotoxicológicos, éstos son los Daphnidos: *Daphnia magna* y *Daphnia pulex*, mientras que con otras especies de cladóceros no se han realizado muchos trabajos

ecotoxicológicos. Un ejemplo de éstos es *Alona rectangula*, que es un organismo litoral que se encuentra ampliamente distribuido, con un ciclo de vida corto, es fácil de cultivar en condiciones de laboratorio, es sensible a diversos agentes tóxicos, ocupa poco espacio y agua; además de poseer un importante significado ecológico (Cañizares, *op. cit.*, 1999). Como se puede apreciar, este organismo cumple con todos los requerimientos que facilitan la realización de pruebas de toxicidad (Persoone y Janssen, 1993; Martínez, *et al.*, 1994 (a)).

ANTECEDENTES

El estudio del efecto de los metales pesados no es algo nuevo, ha sido objeto de investigación desde épocas remotas. En el año 370 a.C., Hipócrates describió por primera vez cólicos abdominales en hombres que extraían metales de las minas. La intoxicación por ingestión de mercurio y arsénico se describió en los años 372 y 383 a.C. por Theophrastus y Erebus, respectivamente; sin embargo, hasta el día de hoy no se conocen con exactitud todos los mecanismos de acción que conllevan a los metales pesados a tener efectos tóxicos (Konigsberg, 2000).

Las primeras investigaciones sobre los niveles de contaminación por metales pesados en los nichos acuáticos se enfrentaron a un problema básico: no se conocía una manera confiable para cuantificar el metal, de manera que no se podía llevar a cabo un estudio comparativo de las cantidades de tóxico presentes en una misma zona en años anteriores. En un primer acercamiento se intentó medir la concentración de mercurio en el hielo polar sin éxito. En la actualidad se utilizan algunos individuos como monitores biológicos como los líquenes, musgos, protozoos, rotíferos y cladóceros entre otros (Konigsberg, 2000).

Martínez y colaboradores, en 1991, utilizando al cladócero *Moina macrocopa*, alimentado con diferentes algas (*Ankistrodesmus convolutus*, *Scenedesmus incrassatulus* y *Chlorella vulgaris*), en concentraciones de: 1.25, 2.5 y 5.0 mg/ L⁻¹, encontraron como insuficiente, a la concentración más baja, y como la mejor concentración 2.5 mg/ L⁻¹. A su vez encontraron que no hay diferencias significativas

con las tres diferentes algas ya que no observaron variaciones en el crecimiento del organismo.

En 1999 Travieso y colaboradores, estudiaron la remoción de metales pesados (zinc, cromo y cadmio) por las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* utilizando el gel kappa-carrageenan y espuma de poliuretano para su inmovilización. Encontraron que *S. acutus* es más eficiente para remover metales que *Chlorella*, así mismo, observaron que ésta soporta concentraciones de zinc, hasta de 600 mg/L^{-1} , pero sufriendo alteraciones morfológicas como: gigantismo y cambios en la forma de la pared celular. Con respecto al cadmio, tanto *Chlorella* como *S. acutus* presentan problemas morfológicos en concentraciones por arriba de 2 mg/L^{-1} , además de que es afectada su reproducción. Esto demuestra que las microalgas *S. acutus* y *Chlorella* inmovilizadas con espuma de poliuretano y gel Kappa-carrageenan, son tolerantes al Cd, Cr y Zn, en concentraciones arriba de las permitidas de estos iones en aguas industriales.

Nelson en 1998, evalúa la sensibilidad del rotífero *Brachionus calyciflorus* y del cladócero *Ceriodaphnia dubia* a la exposición aguda de zinc, cobre, cadmio, malathion, ácido 2,4-diclorofenoxiacético y sales de dipotasio endothall. Determinaron para *C. dubia* una CL_{50} -24hr (Concentración letal) de $132.0 \text{ } \mu\text{g/L}$, y CL_{50} - 48hr de $78.2 \text{ } \mu\text{g/L}$ en organismos expuestos a cadmio.

Sarma y colaboradores en 2000, trabajaron con los tres metales pesados más tóxicos en forma de cloruros (cadmio, cobre, y mercurio), realizando pruebas de toxicidad aguda con dos especies de rotíferos alimentados con *Chlorella vulgaris* en dos concentraciones ($1 \times 10^6 \text{ céls/ ml}^{-1}$ y $3 \times 10^6 \text{ céls/ ml}^{-1}$). Observaron que *Brachionus patulus* es más sensible que *B. calyciflorus*. *B. patulus* fue mas sensible al Cu y *B. calyciflorus* al Cd. A su vez se encontró que el Hg es el más tóxico. Dichos autores concluyeron que la alta concentración de *Chlorella* favoreció a los rotíferos, haciéndolos más resistentes a la toxicidad de los metales pesados.

Baudo, en 1987, hizo una recopilación de trabajos en los que estudiaron la toxicidad en *Daphnia* desde 1973, utilizando el Cd (cadmio), Cu (cobre), Ni (níquel), Se (selenio), herbicidas y petróleo entre otros. En su recopilación nombra a varios autores

que estiman principalmente CL_{50} -96 hrs., y señala que existen diferencias en los datos dependiendo del autor y las variables involucradas en los estudios.

En 1994, Fargasova, evaluó la toxicidad aguda y crónica de varios metales (arsénico (As), plomo (Pb), cromo (Cr), mercurio (Hg), cadmio (Cd)) en individuos de agua dulce (*D. magna* y *Tubifex tubifex*). Estimaron la CL_{50} -24 hrs. y observaron que el mercurio es el metal más tóxico, seguido por el cadmio y después el cromo. Dicha autora cita a Khangarot y Ray (1989), quienes encontraron que la toxicidad de los iones metálicos sobre los individuos es: $Hg > Cd > Pb > Cr > As$. La diferencia entre los resultados de ambos autores se debe a variaciones por factores ambientales como: la temperatura, pH, propiedades fisicoquímicas del agua, los elementos de prueba y las especies biológicas empleadas.

Pica-Granados en el 2000, desarrolló un bioensayo de estandarización para evaluar la calidad del agua utilizando varios individuos, entre ellos el cladóceros *D. magna*, que fue el más sensible a los siguientes compuestos analizados: cobre, cadmio, cromo, arsénico, anilina, nonilfenol, pentaclorofenol, y lindano. El autor evaluó los efectos de tóxicos inorgánicos (cadmio, cromo, cobre, mercurio, zinc y arsénico) y orgánicos (anilina, aldrín, *p,p'* - DDT, 2,4-di-nitrofenol, lindano, metolachlor, 4-nitroquinoleína-N-óxido, nonilfenol, y pentaclorofenol), y la mezcla de (arsénico pentavalente/pentaclorofenol y cadmio/metaloclor) en varios organismos. En la lechuga (*Lactuca sativa*) evaluó los efectos que inhiben la germinación y en la cebolla (*Allium* sp.) los efectos en el crecimiento. También realizó la prueba del efecto letal en 48 h. en el cladóceros (*D. magna*). En (*Hydra attenuata*) realizó la prueba letal en 96 h. y evaluó cambios en la morfología. En el nemátodo *Panagrellus redivivus* midió la inhibición del ciclo de maduración en 96 h.

Wogram y Liess en el 2001, midieron la sensibilidad de diferentes especies de macro vertebrados a tóxicos (compuestos orgánicos y compuestos metálicos) utilizando pruebas de toxicidad aguda como EL_{50} (Efecto letal) y CL_{50} . Todos los valores obtenidos de las pruebas tóxicas fueron comparados con datos obtenidos en pruebas de toxicidad en la especie *D. magna* (Cladóceros). Los macro vertebrados estudiados pertenecen a los órdenes: Amphipoda, Basommatophora, Coleoptera, Copepoda, Decapoda, Diptera, Ephemeroptera, Heteroptera, Hirudinea, Isopoda, Lamellibranchia, Megaloptera,

Monotocardia, Odonata, Oligochaeta, Ostracoda, Plecoptera, Trichoptera y Tricladida. Los parámetros que consideró el autor fueron: inmunidad, intoxicación, mortalidad y reproducción. Observó que el orden Plecoptera fue el más sensible a los compuestos orgánicos, seguido por Amphipoda, Ostracoda y Cladóceras. Para los compuestos metálicos el orden Cladóceras fue el más sensible.

Cañizares en el 2000, evaluó toxicidad aguda de Cd, Zn y la mezcla de Cd-Zn determinando LC_{50} en *D. magna* alimentada con el alga *Chlorella vulgaris*. Realizó dos tratamientos distintos, uno con el alga suspendida y otro con el alga inmovilizada. Con el primero determinó una LC_{50} - 48-h de 0.072 mg/ L^{-1} y con el segundo tratamiento obtuvo un LC_{50} 48-h de 0.63 mg/ L^{-1} . El autor concluye que *D. magna* es más sensible al Cd, menos sensible a la mezcla de Cd-Zn y mucho menos sensible al Zn.

En 1998 Hartgers y colaboradores realizaron un experimento para evaluar toxicidad crónica de una mezcla de 3 herbicidas (atrazina, diuron y metalocloro), en individuos del fitoplancton y zooplancton (copépodos, rotíferos y cladóceros). En este estudio, algunos taxa murieron. Los cladóceros, como *Daphnia galeata* sufrieron un pequeño pero significativo decremento en abundancia, mientras que los copépodos sufrieron un efecto inverso.

Vanegas y colaboradores, en 1997, evaluaron la toxicidad aguda y sinergismo del cadmio y zinc en el camarón blanco; observaron que el cadmio es 44 veces más tóxico que el zinc y que en combinación, aumenta su toxicidad.

Atwell en 1998, estudió la biomagnificación y bioacumulación del mercurio en la cadena alimenticia de algunos individuos (12 invertebrados, 2 peces, 8 aves y 5 mamíferos marinos del ártico). El estudio de dichos fenómenos fue abordado mediante el análisis de la concentración de mercurio alojado en el tejido muscular (con excepción de los invertebrados pequeños (<5 mm), en donde todo el cuerpo fue utilizado). Posteriormente midieron la concentración del isótopo $\delta^{15}\text{N}$. En *Mya truncata* (almeja) (que en este estudio ocupa el primer lugar en la cadena alimenticia), determinaron un promedio menor de $\delta^{15}\text{N}$ que el determinado en *Ursus maritimus* (oso polar), que es el último en la cadena alimenticia. En *Crossaster papposus* y *Leptasterias* sp. (pez estrella) la concentración total de mercurio fue menor que para *Monodon monoceros* (narval). Estos datos indican la existencia de biomagnificación y una baja bioacumulación. Así

mismo, observaron que el mercurio se encuentra en concentraciones bajas en individuos que acumulan muchos lípidos, por lo que éstos no son un buen puente de transferencia para el mercurio. Por lo anterior, el autor concluye que el mercurio se acumula en los individuos en mayor concentración conforme a su posición en la cadena alimenticia, sin embargo no encontró evidencias de la acumulación del mercurio a través del tiempo en el tejido muscular.

Baca en el 2000, estudió los efectos tóxicos de los siguientes compuestos: metil mercurio, chlorpyrifos, atrazina, metano arsonato monosodico, además de luz UV en sistemas planctónicos de un mesocosmos (humedal) de 500 L. Se analizó el tamaño de distribución. El microcosmos tratado con metil se encontró a un nivel ambiental de 0.2 mg/kg de peso húmedo al emplear una concentración baja. Para la concentración alta el nivel ambiental fue de 0.4 mg/kg de peso húmedo. Observaron que el metil mercurio siempre altera la forma y biomasa de la distribución. El autor observó que los individuos $>10 \mu\text{m}$ generalmente disminuyen su biomasa, mientras que los individuos $<500 \mu\text{m}$ son más abundantes y su biomasa aumentó 75% cuando el metil mercurio se encontró en concentración baja. Por otra parte, reportó que el efecto negativo del metil mercurio en los individuos más pequeños (que son los productores primarios de la comunidad planctónica) aumentó en los días 1-4. Como consecuencia, el número de individuos más grandes disminuyó en los días 8 y 16. Aunque el pez gato no sea un organismo planctónico, se encontró en el cuerpo de agua y acumuló el metil mercurio en sus tejidos, pero no se observó efecto negativo en su sobre vivencia. El autor concluyó que el metil mercurio se bioacumula y es tóxico en la mayoría de los individuos del sistema, afectando a la comunidad planctónica en mayor grado que los herbicidas e insecticidas, por lo que sugiere que se necesitan evaluaciones de los efectos tóxicos en comunidades y ecosistemas.

En 1998 González y colaboradores, evaluaron los efectos del cadmio y plomo en la cadena trófica marina y detectándola únicamente en la cadena trófica bentónica-demersal. Los organismos de dicha cadena se alimentan de materia orgánica en los sedimentos marinos, donde estos metales son acumulados durante todo el año en condiciones anóxicas (oxígeno mínimo). También encontraron que en condiciones hipóxicas (donde el oxígeno disuelto aumenta), los metales se solubilizan, y que un

cambio en la composición normal del agua de mar puede afectar la adsorción o desorción del metal. El cadmio fue encontrado en los sedimentos de la bahía del Norte de Chile en una concentración de un intervalo de 0-20 μ /g.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la importante repercusión de los metales pesados sobre los organismos (acuáticos y no acuáticos) y en el uso de aguas contaminadas consumidas por el hombre, se han realizado estudios de toxicidad en diversas especies, sin embargo, en México son escasos los trabajos sobre los daños que los metales pesados ocasionan a las comunidades acuáticas, en particular el zooplancton que es el grupo de organismos más sensible a toxicidad por metales pesados.

Actualmente en México son pocos los grupos que estudian organismos como indicadores biológicos, por lo que recientemente se han iniciado estudios con rotíferos y cladóceros (Sarma, *et al.*, 1998; Rico-Martínez, *et al.*, 1999; Sarma, *et al.*, 2000) para evaluar ecotoxicidad. A pesar de ello, los trabajos realizados a la fecha se enfocan únicamente a los Daphnidos (por su gran tamaño) y no se les da importancia a la gran cantidad de cladóceros que existen, por lo que este trabajo se enfoca en el estudio del organismo *Alona rectangula* planteando los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

GENERAL

Estimar diferentes niveles tóxicos del cadmio y mercurio en condiciones de restricción de densidad alimenticia en el Cladócero *Alona rectangula*.

ESPECIFICOS

- Determinar la concentración letal media (CL₅₀-24 h) del cadmio y mercurio para el cladócero, *Alona rectangula*

Falta página

N° 16

Diagrama de flujo

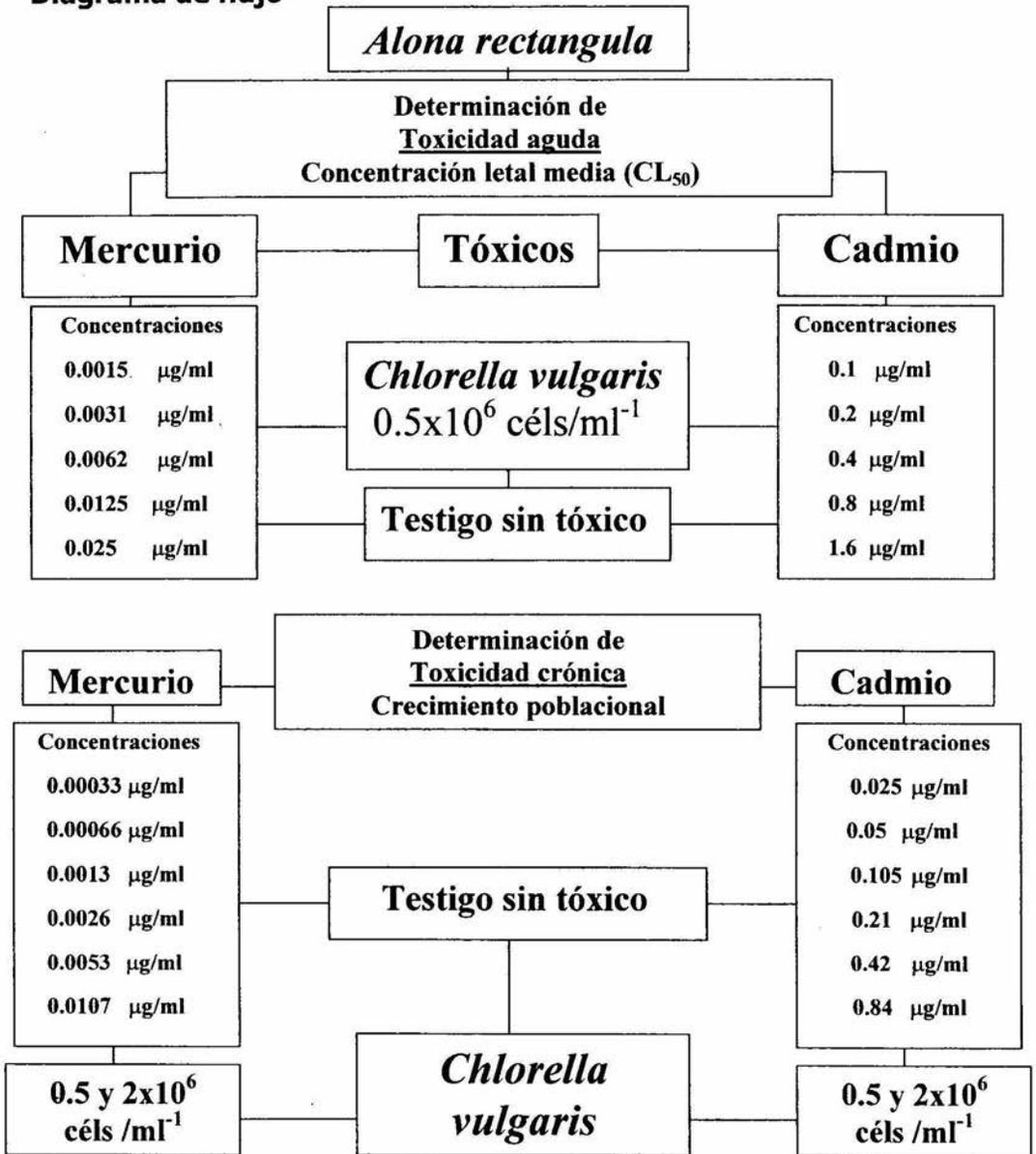


Figura 1. Diagrama donde se muestra la ruta del experimento.

MATERIALES Y MÉTODOS

El cladóceros *Alona rectangula* (Sars, 1867), fue aislado del Lago de Chapultepec. Esta especie fue cultivada en masa en un acuario de vidrio de 4-L en una solución fisiológica estandarizada conocida como "agua reconstituida ó medio EPA". Este medio fue preparado disolviendo en 20 L de agua destilada: 1.9 g de NaHCO_3 , 1.2 g de CaSO_4 , 1.2 g MgSO_4 y 0.04 g de KCl (pH 7.5) (Anónimo, 1985). El cultivo de *Alona rectangula* fue alimentado con el alga verde *Chlorella vulgaris* a una densidad de 2×10^6 céls/ ml^{-1} .

El alga *Chlorella vulgaris* fue cultivada en masa, bajo condiciones asépticas colocándola en botellas de 2 L, con iluminación artificial continua (aproximadamente 1000 - 2000 lux) las 24 horas del día a 25-26°C en medio basal de Bold (Borowitzka y Borowitzka, 1988) (ver Anexo). Como fuente de carbono adicional al medio de crecimiento se utilizó bicarbonato de sodio y se cultivó hasta que el alga se encontrara en fase de crecimiento logarítmico (durante 15 días aproximadamente). Posteriormente se colocaron a 4°C hasta que el alga sedimentara. Después se decantó el sobrenadante para concentrar el alga y se realizó un conteo de células utilizando una cámara de Neubauer observando mediante microscopía óptica a una magnificación 10 X (Gama y colaboradores, 2001).

Para las pruebas de toxicidad se elaboraron soluciones patrón de cloruro de cadmio (CdCl_2) y cloruro de mercurio (HgCl_2), ambas a una concentración de 1000 mg/L^{-1} en agua destilada y se mantuvieron en refrigeración en botellas ámbar. Dichas soluciones fueron renovadas cada 30 días. De las soluciones patrón se derivaron soluciones a una concentración de 10, 000 $\mu\text{g/ml}$, mismas que se renovaron cada semana. A partir de éstas se tomaron los volúmenes adecuados para diluirse en medio EPA y obtener las concentraciones experimentales deseadas (Figura 1).

Fase experimental

Se evaluó la toxicidad aguda y crónica para ambas sustancias químicas. Para ello fue necesario primero determinar el intervalo experimental (range finding test). Con esta prueba se determinó el rango aproximado de concentraciones del tóxico mediante el uso de una gama de concentraciones logarítmicas del mismo, incluyendo entre ellas

una que elimine a todos los organismos, otras a pocos organismos y otras a ninguno. Una vez obtenida la concentración o concentraciones en las que los individuos sobreviven, se hizo una dilución en serie, definida como la constante por la que hay que multiplicar una concentración dada para obtener la siguiente en orden descendente (American Public Health Association, 1992).

La dilución en serie nos permitió obtener la escala completa de concentraciones para realizar la prueba de toxicidad aguda, expresada como la concentración letal media (CL_{50}). Una vez calculada la concentración letal media mediante el Método Probit o Método de las Unidades Probabilísticas se determinaron los niveles de tóxico para realizar la prueba de toxicidad crónica mediante crecimiento poblacional.

La toxicidad aguda (CL_{50}), se define como la mortalidad en una prueba individual a diferentes tiempos bajo diferentes concentraciones del tóxico (Sarma y Nandini, 1999)

Range finding test

Para determinar el intervalo experimental se realizaron pruebas en viales de vidrio de 100 ml con un volumen total de 50 ml para cada tóxico. Se utilizó como alimento *Chlorella vulgaris* en una densidad de 0.5×10^6 céls/ ml^{-1} en medio EPA. En cada vial se introdujeron 10 individuos de diferentes edades, que fueron expuestos el tóxico durante 24 hrs. Posteriormente se estimó la mortandad, contando los individuos vivos succionándolos con una pipeta Pasteur bajo microscopía estereoscópica a 40 aumentos. El criterio de muerte en los individuos fue la ausencia de movimiento (Sarma y Nandini, 1999). Las concentraciones nominales utilizadas para determinar el intervalo experimental con cadmio y mercurio fueron las siguientes: 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 1, 10 mg /L^{-1} y un grupo testigo (sin tóxico).

Concentración letal media (CL_{50})

Para esta prueba se estimó la concentración a la cual muere el 50 % de la población experimental (CL_{50}).

Este bioensayo consistió en exponer a 20 individuos de una edad promedio de la primera reproducción a 5 concentraciones de Cd y Hg. Dicho ensayo se realizó en viales

de vidrio de 100ml con un volumen total de 50 ml, de los cuales, 25 ml son de medio EPA. Además del grupo experimental se mantuvo un grupo testigo (sin tóxico). De cada concentración se analizaron tres replicas. Los individuos fueron expuestos al tóxico durante un periodo de 24 h y posteriormente se determinó la mortandad mediante el conteo de los individuos vivos succionándolos con una pipeta Pasteur observando a través de un microscopio estereoscópico a 40 aumentos. El criterio de muerte en los individuos fue la ausencia de movimiento (Sarma y Nandini, 1999).

Las concentraciones del tóxico probadas fueron: Para cadmio 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 mg/ L⁻¹, y para mercurio 0.000078, 0.0015, 0.0031, 0.0062, 0.0125, 0.025 y 0.05 mg/ L⁻¹, estas concentraciones se prepararon por dilución en serie a partir de la solución patrón. A cada vial se agregó *Chlorella vulgaris* a una densidad de 0.5x10⁶ células/ ml⁻¹ en medio EPA. Cada envase tuvo un volumen total de 50 ml. Las concentraciones de tóxico para esta prueba se obtuvieron mediante diluciones en serie.

Crecimiento poblacional

Los efectos a largo plazo se definen como cambios que pueden estar relacionados con el apetito y metabolismo. Como consecuencia de éstos, se afectan el crecimiento y la tasa de reproducción (Sarma y Nandini 1999). Para la prueba de toxicidad crónica se estimó el crecimiento poblacional con las siguientes concentraciones de tóxico: para el cadmio: 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.105 y 0.21 mg /L⁻¹ y para el mercurio 0.00033, 0.00066, 0.0013, 0.0026, 0.0053 y 0.0107 mg /L⁻¹. Estas concentraciones fueron calculadas con el Método Probit o Método de las Unidades Probabilísticas utilizando el resultado obtenido del CL₅₀-24 h. Este método es utilizado para evaluar la relación dosis-respuesta de un contaminante sobre un organismo (Finney, 1971).

El ensayo consistió en exponer a 20 individuos en edad promedio de la primera reproducción a 6 concentraciones de Cd y Hg con tres replicas cada una. Se utilizaron viales de vidrio de 100ml con un volumen total de 50 ml (25 ml de medio EPA). Se analizó además un grupo testigo (sin tóxico). Los individuos sobrevivientes se contaron cada 24 hrs mediante succión con una pipeta Pasteur al microscopio estereoscópico a

40 aumentos. Los individuos fueron transferidos a viales con el medio, (alga y tóxico) en concentraciones antes mencionadas. Los cladóceros vivos se cambiaron de envase filtrándolos a través de una malla de 50 μm . En los recambios diarios se mezcló el doble de las concentraciones requeridas tanto del tóxico como del alga en proporciones iguales antes de usar el medio con el fin de evitar una posible pérdida del tóxico, ocasionada por la presencia del alga en ausencia de los individuos experimentales. Se retiraron los individuos muertos para evitar una posible contaminación ajena a la del tóxico. Cada tratamiento duró aproximadamente 20 días, día en que las poblaciones experimentales empezaron a decaer.

Debido a que las algas son esenciales en el crecimiento poblacional se probaron dos tratamientos, cada uno con una densidad distinta de alimento. Se manejaron densidades de 0.5 y 2×10^6 céls / ml^{-1} de *Chlorella vulgaris* en medio EPA. Para el grupo testigo no se añadió tóxico y se le agregó la misma densidad de alimento.

Para evaluar el efecto del tóxico y la densidad alimenticia en el medio se estiman las siguientes variables de la población: crecimiento poblacional, máxima densidad alcanzada, tiempo en el que se alcanza la máxima densidad y la tasa intrínseca de crecimiento poblacional por día (r) (Sarma y Nandini, 1999).

Para estimar la tasa de crecimiento poblacional (r) se usó la ecuación exponencial de Krebs (1985): $r = (\ln N_t - \ln N_0)/t$, donde N_0 = densidad inicial; N_t = densidad final (ind. ml^{-1}) y t es el tiempo en días.

Para establecer la significancia de los efectos de las concentraciones de los tóxicos, en los dos niveles de alimento se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (Sokal, 2000)

RESULTADOS

Comparando el impacto tóxico de los metales pesados, ambos ejercieron un efecto significativo en las respuestas de *Alona rectangula* tanto a exposición aguda como crónica. La magnitud de los efectos dependió del nivel de alimentación (0.5 y 2×10^6 céls/ ml^{-1}); pues en general, siempre fue mayor en condiciones de poco alimento. Con respecto a los dos tóxicos, el mercurio resultó sustancialmente más tóxico para *Alona* que el cadmio.

Toxicidad aguda

El intervalo de tolerancia para *Alona rectangula*, fue entre 0.1 a 1 mg /L⁻¹ durante una exposición de 24 hrs para cadmio y para mercurio se encontró una concentración nominal que va de 0.01 a 1 mg /L⁻¹ (todas las concentraciones fueron nominales).

Los valores obtenidos en este estudio para evaluar la concentración letal media (CL₅₀) fueron los siguientes: en la exposición a cadmio con base en la ecuación $y = 5.399 + 4.039 \times \text{Log}_{10}$ el valor fue de 0.838 mg /L⁻¹ (Figura 2) y en exposición a mercurio con base en la ecuación $y = 14.536 + 4.836 \times \text{Log}_{10}$ fue de 0.0107 mg /L⁻¹ (Figura 3).

En los datos obtenidos para la concentración letal media, se observó que el mercurio es 80 veces más tóxico que el cadmio, esto se puede visualizarse al comparar los valores obtenidos para cada metal.

Toxicidad crónica

En general, la tendencia de las curvas de **crecimiento poblacional** para cadmio con los dos niveles alimenticios (Figura 4 y 5) muestra que las poblaciones crecieron en relación al incremento en la cantidad de alga disponible en el medio. Sin embargo para el mercurio no fue así, ya que éste es 80 veces más tóxico que el cadmio, esto se ve reflejado negativamente en la sobre vivencia de la población (Figura 4 y 5).

Las respuestas del cladóceros en exposición crónica indican que *Alona rectangula* presentó un crecimiento poblacional significativamente (PL 0.001) reducido, mostrando un resultado 50% menor que el presentado por el grupo testigo, aún cuando estuvo expuesto a concentraciones de 0.0026 y 0.0125 mg /L⁻¹ de cadmio y mercurio respectivamente. Cabe destacar que dicho comportamiento fue más pronunciado cuando los individuos estuvieron expuestos a una mayor concentración de alimento en el medio (Figura 4 y 5). Por otro lado el mercurio nos permitió ver que el cladóceros aumenta en su crecimiento poblacional mas o menos de manera gradual en relación a los incrementos de concentraciones de este metal en el medio. Sin embargo este comportamiento fue diferente con el cadmio, el cuál indujo respuestas poblacionales muy parecidas aún en diferentes concentraciones del tóxico.

En general a mayor densidad alimenticia, la magnitud de toxicidad de ambas poblaciones fue mayor.

Densidad máxima

En general se observó que los individuos expuestos a cadmio alcanzan primero su densidad máxima que los expuestos a mercurio, que es más tóxico. Se observó que el cladóceros *Alona rectangula* alcanzó su densidad máxima cuando estuvo expuesto a la menor concentración de cadmio. La tendencia fue más pronunciada a mayor nivel de alimento en el medio de crecimiento (Figura 6).

Para el mercurio se observó que *Alona* alcanza su densidad máxima alrededor de una concentración de $0.00066 \text{ mg/L}^{-1}$ del tóxico y las concentraciones fueron cuantitativamente superiores en presencia de la densidad más baja de alimento 0.5×10^6 céls/ml que con la más alta 2×10^6 céls/ml (Figura 7). Como puede apreciarse, el mercurio induce un patrón inverso al del cadmio en la densidad.

A individuos de la especie *Alona rectangula*, a los que se administró cadmio, fueron alimentados con la densidad más baja de alimento y presentaron una densidad máxima con un rango que va de 40 a 360 indiv./50 ml, mientras que para los individuos que no se les administró tóxico (grupo testigo) presentaron una densidad máxima de 455 indiv./50 ml. A su vez, los individuos que fueron alimentados con la densidad más alta de alimento presentaron una densidad máxima en un rango que va de 25 a 700 indiv./50 ml. Los individuos a los que no se les administró tóxico (grupo testigo) presentaron una densidad máxima de 1700 indiv./50 ml (Figura 6).

Los individuos a los que se administró mercurio, que se alimentaron con la densidad más baja de alimento, presentaron una densidad máxima con un rango, que va de 20 a 200 indiv./50 ml. A su vez, los individuos que fueron alimentados con la densidad 2×10^6 céls /ml⁻¹ de *Chlorella*, presentaron una densidad máxima con un rango que va de 40 a 100 indiv./50 ml (Figura 7).

En el caso de los individuos expuestos a cadmio, hubo un efecto significativo dependiendo ($P < 0.001$, ANOVA con dos factores) de la densidad de alimento, así como de la concentración de tóxico y la interacción de ambos factores (Tabla 1). Con mercurio, hubo un efecto significativo ($P < 0.001$, ANOVA con dos factores) de la

densidad de alimento, así como de la concentración de tóxico, pero la interacción de los dos factores no causó efectos significativos (Tabla 2).

Día de densidad máxima

En general, se observó que *Alona rectangula* expuesto a cadmio con la densidad de alimento baja (0.5×10^6 céls/ml) alcanzó su densidad máxima alrededor del día 16. Esto se observó también para la población testigo, mientras que la población expuesta a cadmio con una alta densidad de alimento 2×10^6 céls/ml osciló alrededor del día 20 al igual que la población testigo. El día de densidad máxima fue independiente de la concentración del tóxico en el sistema experimental (Figura 8).

La población expuesta a mercurio se comportó similar sólo para los niveles bajos del alimento, ya que para los niveles altos, el día de densidad máxima se alcanzó entre los 8 y 10 días, presentándose una disminución de la población expuesta a la concentración alta de alimento (Figura 9).

Los individuos a los cuáles se administró cadmio y se alimentaron con la densidad más baja de alimento presentaron su densidad máxima entre los días 2 y 21, mientras que en el grupo testigo la densidad máxima se alcanzó el día 14.

A su vez, a los que se les administró la densidad más alta de alimento, presentaron un rango que va del día 2 al 22, mientras que el grupo testigo alcanzó su densidad máxima el día 20 (Figura 8).

Los individuos a los que se administró mercurio, y se les alimentó con la densidad más baja de alimento, presentaron una densidad máxima en un rango que va de 1 a 16 días, mientras que los individuos a los que no se administró tóxico (grupo testigo), la densidad máxima se alcanzó el día 14. A su vez, a los que se les administró la densidad más alta de alimento, presentaron un rango que va del día 1 al 11 y el grupo testigo llegó a su densidad máxima el día 20 (Figura 9).

En los individuos que fueron expuestos a cadmio, se observó un efecto significativo ($P < 0.001$, ANOVA de dos factores) de la densidad de alimento, así como de la concentración de tóxico y la interacción de ambos factores (Tabla 1). En el caso del mercurio, hubo un efecto significativo ($P < 0.001$, ANOVA de dos factores) de la

densidad de alimento, así como de la concentración de tóxico y la interacción de ambos factores (Tabla 2).

Tasa de crecimiento poblacional por día (r)

Cadmio- Los individuos a los que se administró la densidad más baja de alimento (0.5×10^6 céls /ml⁻¹) presentaron una tasa en un intervalo de 0.22 ind/día⁻¹. Para el grupo testigo y para la concentración más alta (0.21 mg /L⁻¹) de cadmio se obtuvo en un intervalo de -0.720 ind/día⁻¹, mientras que para la densidad más alta de alimento (2×10^6 céls /ml⁻¹) el grupo testigo tuvo un intervalo de 0.224 ind/día⁻¹, y para la concentración más alta (0.21 mg /L⁻¹) del metal pesado la tasa se presentó en un intervalo de -0.460 ind/día⁻¹ (Figura 10).

Mercurio- Los individuos tratados con la densidad más baja de alimento (0.5×10^6 céls /ml⁻¹) presentaron una tasa en un intervalo de 0.22 ind/día⁻¹ para el grupo testigo y para la concentración más alta (0.0107 mg /L⁻¹) de mercurio se obtuvo en un intervalo de -0.124 ind/día⁻¹. Los individuos tratados con la densidad más alta de alimento (2×10^6 céls /ml⁻¹) presentaron una tasa en un intervalo de 0.224 ind/día⁻¹ para el grupo testigo y para la concentración más alta (0.0107 mg /L⁻¹) de tóxico se obtuvo una tasa en un intervalo de -0.666 ind/día⁻¹ (Figura 11).

Para los individuos que fueron expuestos a cadmio, se obtuvo un efecto significativo ($P < 0.001$, ANOVA de dos factores) de la densidad de alimento, así como de la concentración de tóxico, sin embargo, la interacción de ambos factores no causó un efecto significativo (Tabla 1). En el caso de mercurio, hubo un efecto significativo ($P < 0.001$, ANOVA de dos factores) de la densidad de alimento, así como de la concentración del tóxico y la interacción de los ambos factores (Tabla 2).

Concentración letal (CL_{50}) con Cloruro de cadmio ($CdCl_2$)

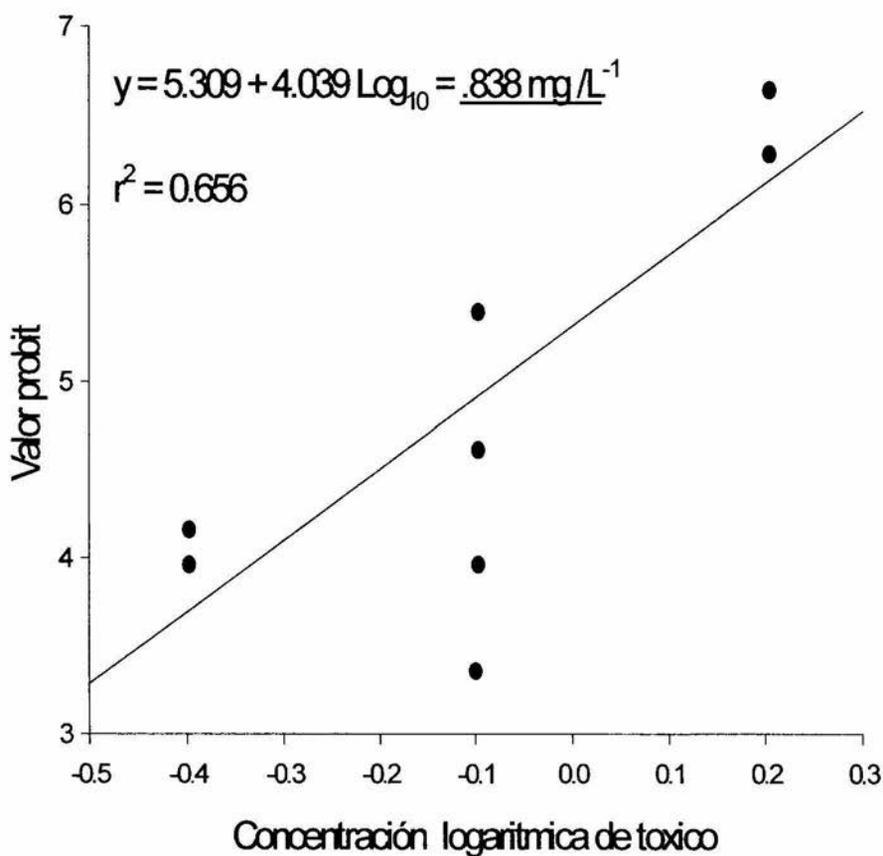


Figura 2. Concentración letal media (CL_{50}) de *Alona rectangularis* con una exposición de 24hrs. para cadmio con una densidad de 0.5×10^6 céls ml^{-1} de *Chlorella vulgaris*.

Concentración letal (CL₅₀) con Cloruro de mercurio (HgCl₂)

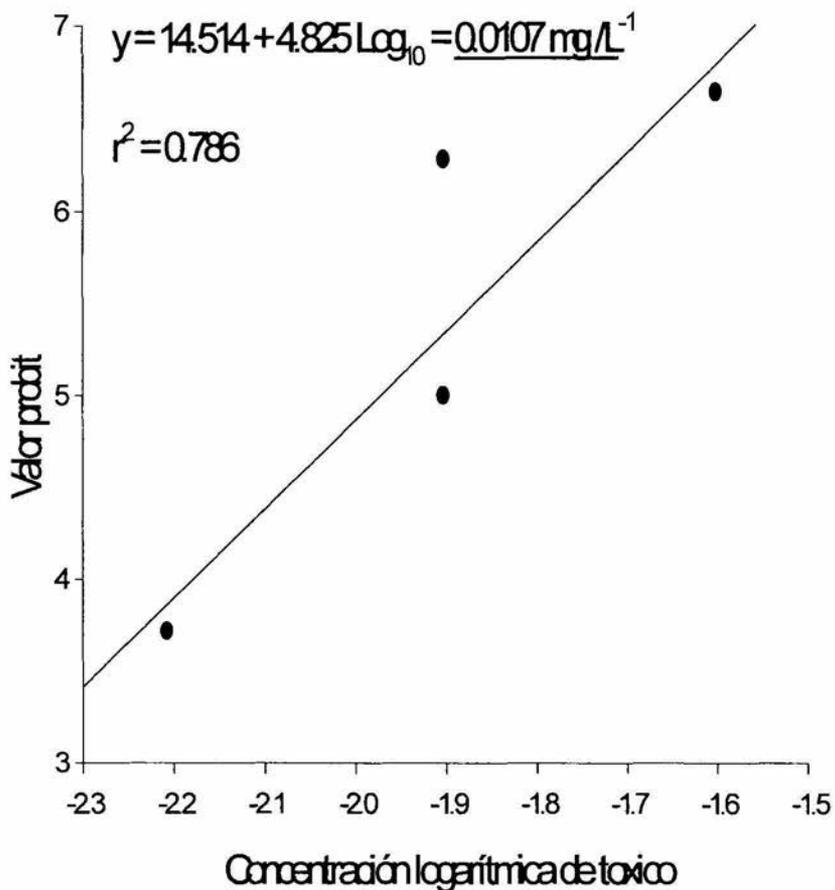


Figura 3. Concentración letal media (CL₅₀) de *Alona rectangularis* con una exposición de 24 hrs. para mercurio con una densidad de 0.5×10^6 céls /ml⁻¹ de *Chlorella vulgaris*.

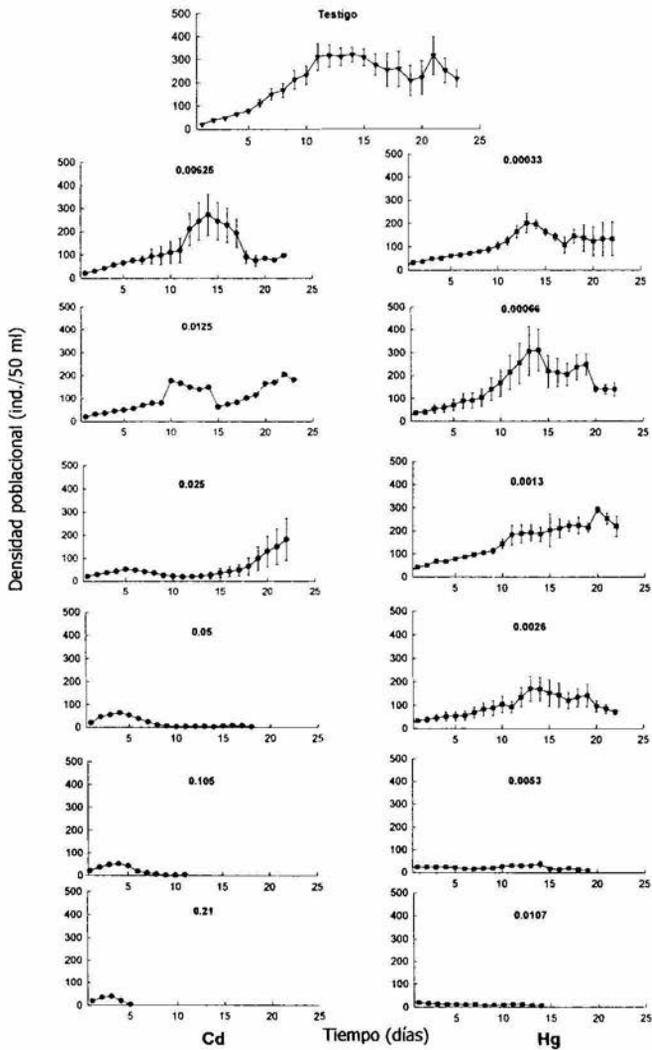


Figura 4. Relación del crecimiento poblacional con diferentes concentraciones de metales pesados (mg/L^{-1}), cadmio (círculos), mercurio (cuadrados), en grupos experimentales y un grupo testigo (triángulos), que fue el mismo para los dos tóxicos. La alimentación constó de *Chlorella vulgaris* a una densidad de 0.5×10^6 cél/ml. Valor promedio y estándar

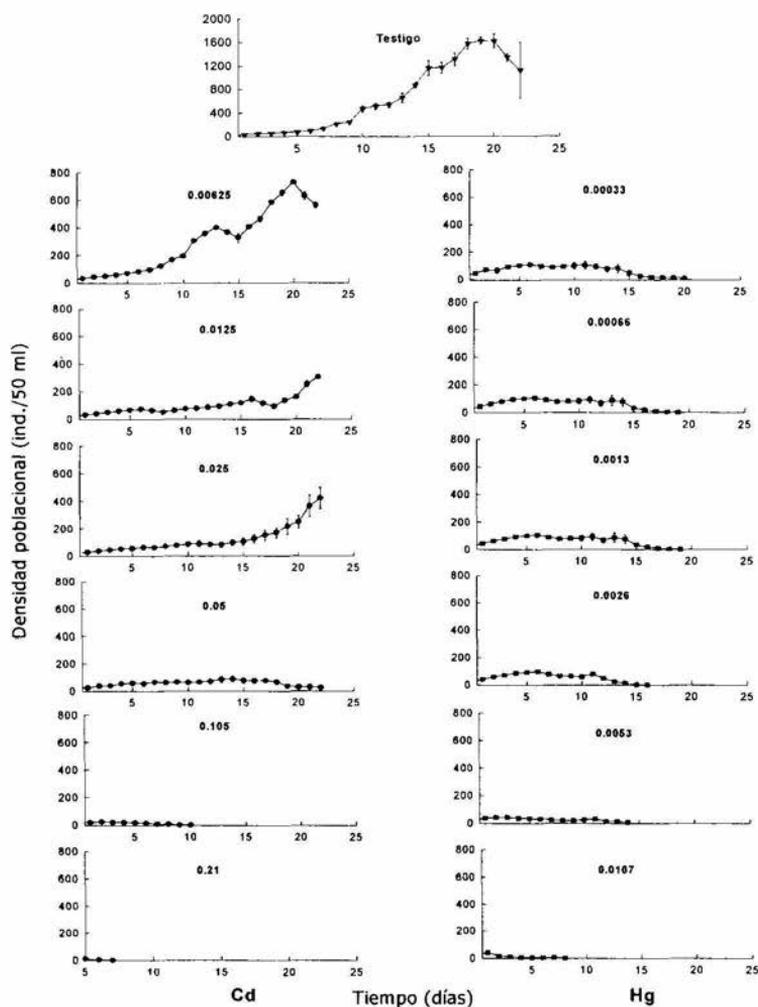
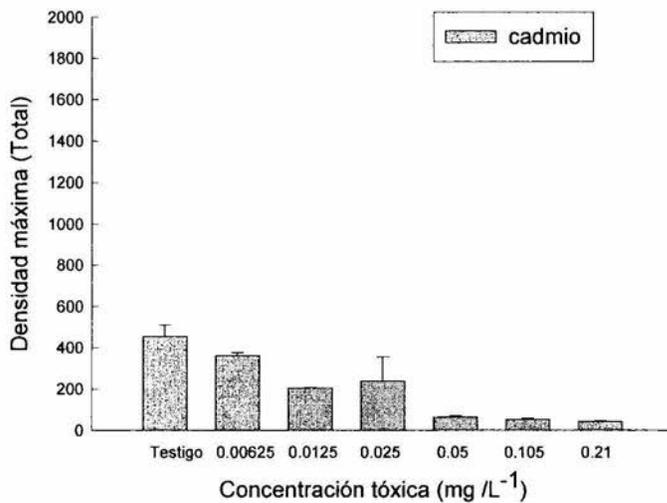


Figura 5. Relación del crecimiento poblacional entre diferentes concentraciones de metales pesados (mg/ L^{-1}), cadmio (círculos), mercurio (cuadrados) en grupos experimentales y un grupo testigo (triángulos), que fue el mismo para los dos tóxicos. Los grupos se alimentaron con *Chlorella vulgaris* a una densidad de 2×10^5 cél./ml. Valor promedio y estándar

Densidad alimenticia 0.5×10^6 céls/ml de *Chlorella vulgaris*



Densidad alimenticia 2×10^6 céls/ml de *Chlorella vulgaris*

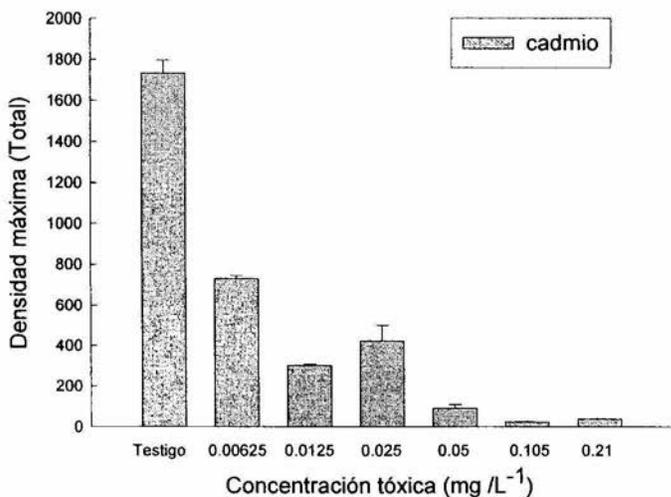
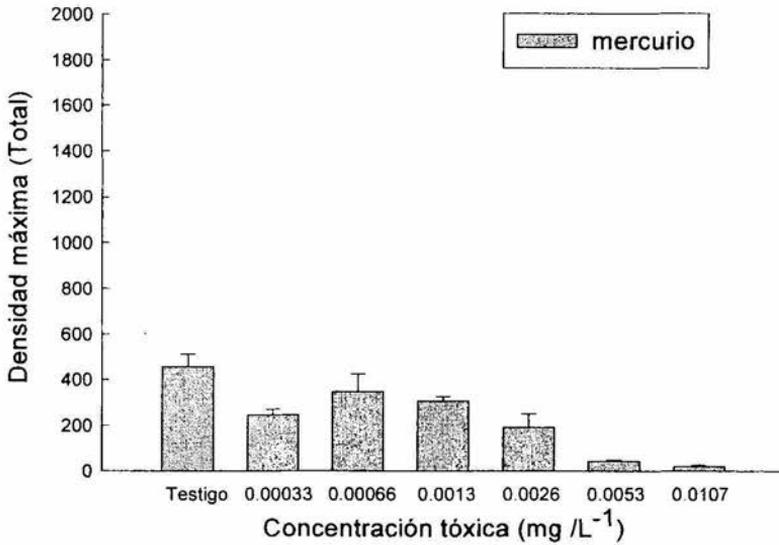


Figura 6. Relación de la densidad máxima entre las diferentes concentraciones de *Chlorella vulgaris* (0.5 y 2×10^6 cél/ml) a diferentes niveles de cadmio. Valores promedio y error estándar.

Densidad alimenticia 0.5×10^6 céls/ml de *Chlorella vulgaris*



Densidad alimenticia 2×10^6 céls/ml de *Chlorella vulgaris*

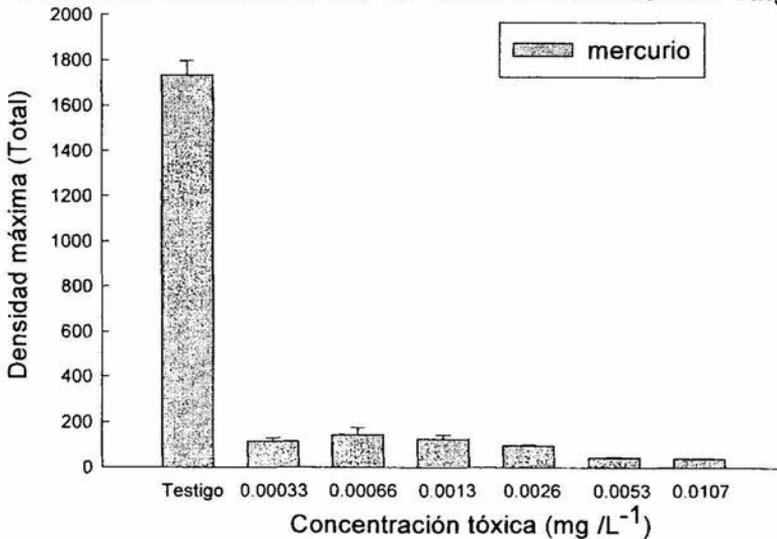
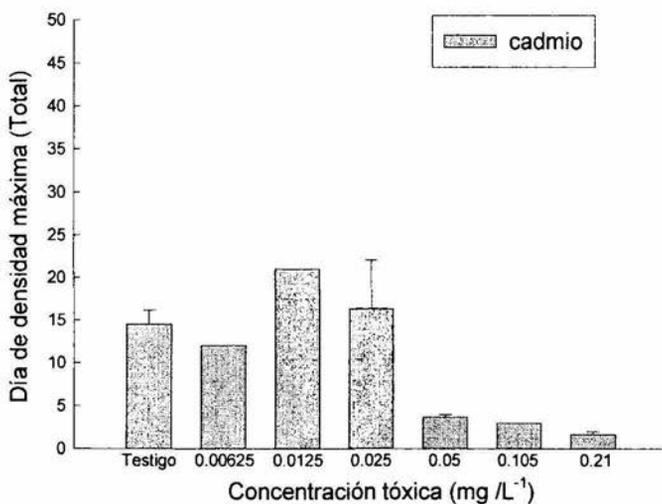


Figura 7. Relación de la densidad máxima entre las diferentes concentraciones de *Chlorella vulgaris* (0.5 y 2×10^6 cél/ml) a diferentes niveles de mercurio. Valores promedio y error estándar.

Densidad alimenticia 0.5×10^6 céls/ml de *Chlorella vulgaris*



Densidad alimenticia 2×10^6 céls/ml

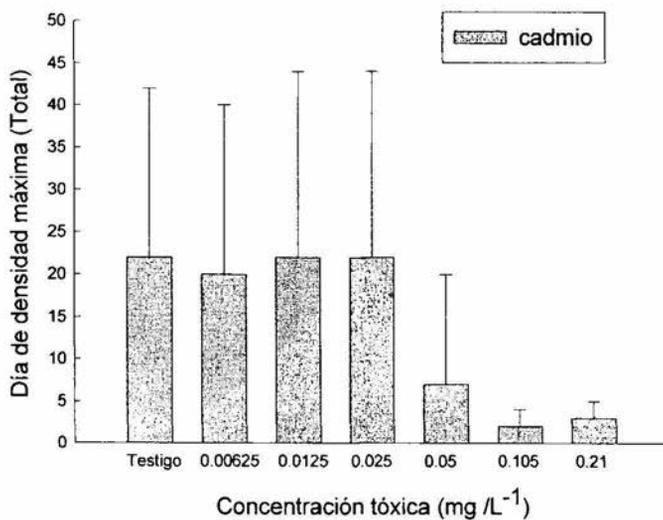
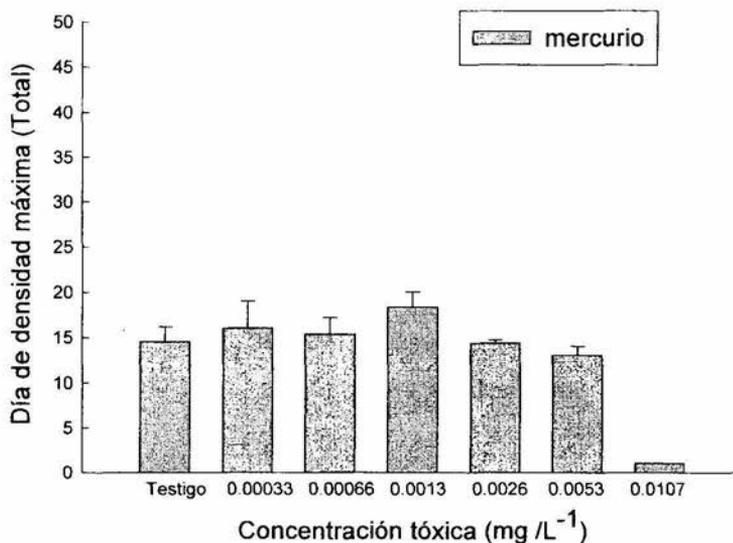


Figura 8. Relación del día de densidad máxima entre las diferentes concentraciones de *Chlorella vulgaris* (0.5 y 2×10^6 cél/ml) a diferentes niveles de cadmio. Valores promedio y error estándar.

Densidad alimenticia 0.5×10^6 céls/ml de *Chlorella vulgaris*



Densidad alimenticia 2×10^6 céls/ml de *Chlorella vulgaris*

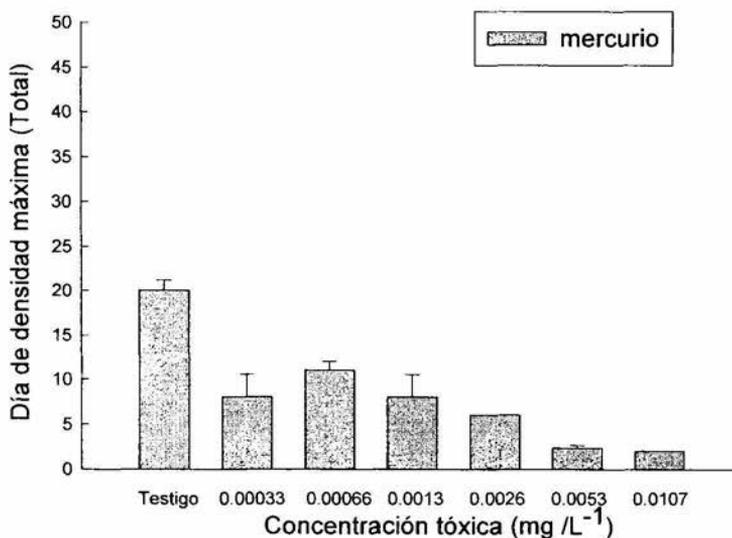
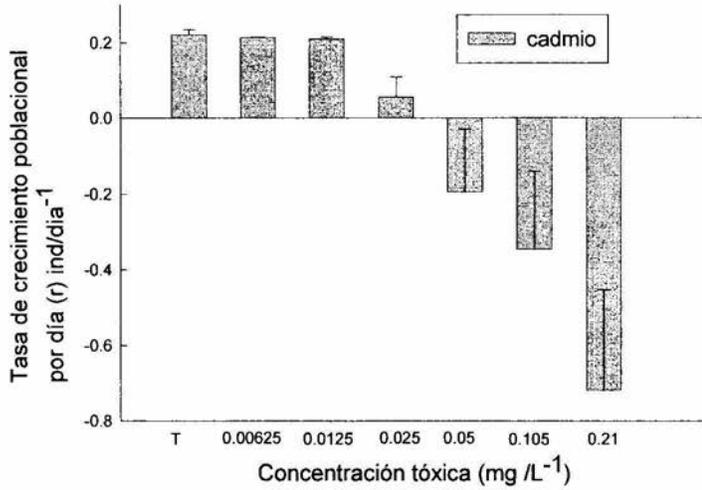


Figura 9. Relación del día de densidad máxima entre las diferentes concentraciones de *Chlorella vulgaris* (0.5 y 2×10^6 cél/ml) con diferentes niveles de mercurio. Valores promedio y error estándar.

Densidad alimenticia 0.5×10^6 céls/ml de *Chlorella vulgaris*



Densidad alimenticia 2×10^6 céls/ml de *Chlorella vulgaris*

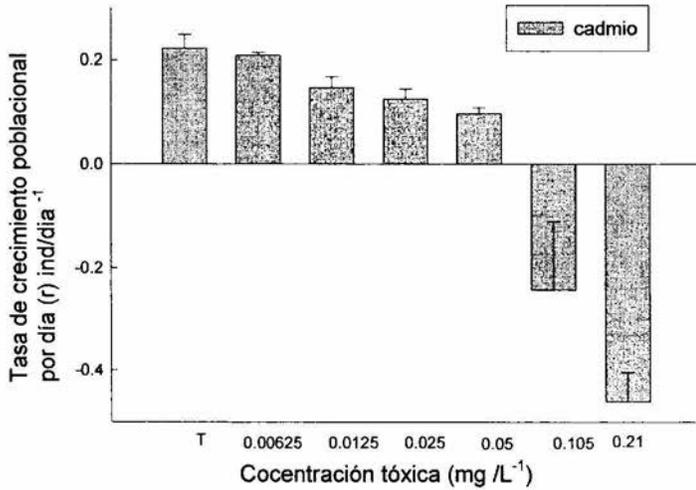
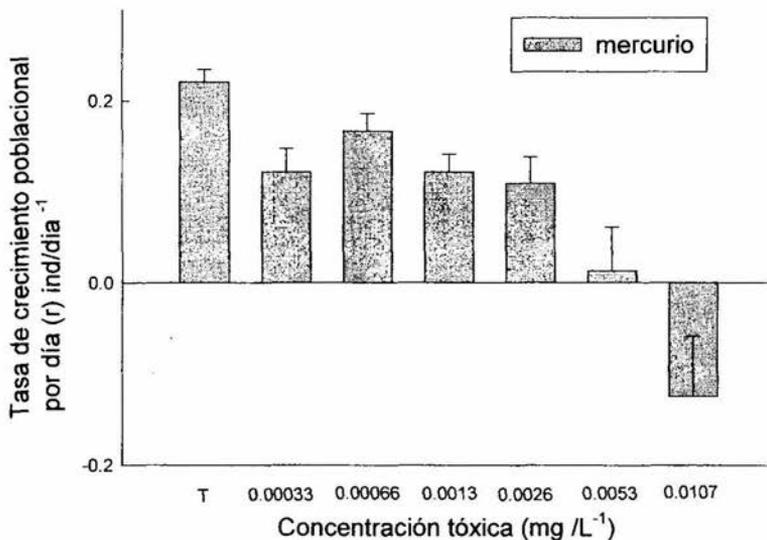


Figura 10. Relación de la tasa de crecimiento poblacional por día (r) entre diferentes concentraciones de *Chlorella vulgaris* (0.5 y 2×10^6 cél/ml) con diferentes niveles de cadmio. Valores promedio y error estándar.

Densidad alimenticia 0.5×10^6 céls/ml de *Chlorella vulgaris*



Densidad alimenticia 2×10^6 céls/ml de *Chlorella vulgaris*

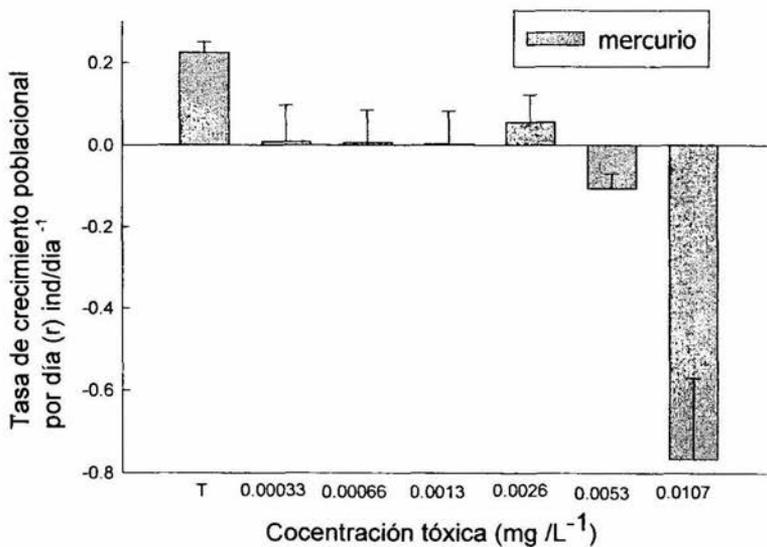


Figura 11. Relación de la tasa de crecimiento poblacional por día (r) entre diferentes concentraciones de *Chlorella vulgaris* ($0.5 \times 2 \times 10^6$ cél/ml) con diferentes niveles de mercurio. Valores promedio y error.

DISCUSIÓN

Las concentraciones registradas en este estudio son de particular interés ya que se han reportado concentraciones de tóxico de 0.0046 ± 0.0023 mg/kg de cadmio, en cuerpos de agua contaminado por actividades antropogénicas y en sedimentos de agua no contaminada se han encontrado concentraciones de cadmio de 0.04 a 0.8 mg/kg (Merian, 1991). Se ha documentado la toxicidad de algunos metales pesados, insecticidas y otros tóxicos para varias especies de rotíferos, por ejemplo *Brachionus patulus*, *Brachionus calyciflorus*, *Asplanchna sieboldi*, para oligoquetos como *Tubifex tubifex* y para cladóceros como *Daphnia magna* entre otros.

Toxicidad aguda

Existen numerosas investigaciones en la última década sobre el efecto agudo (CL_{50}) de sustancias tóxicas (incluyendo algunos metales pesados) en una amplia gama de invertebrados acuáticos. Resulta interesante distinguir que en el intervalo <1 mg/L, muchos organismos decaen notablemente, señalando que son organismos de distintas formas biológicas y taxonómicas.

Por ejemplo, Fargosova (1994) trabajó con el oligoqueto *Tubifex tubifex* y el cladócero *Daphnia magna* exponiéndolos a toxicidades agudas con mercurio y cadmio. Estimó que las concentraciones letales medias (en 24 h), de *Tubifex tubifex* oscilan, entre $0.48 - 0.55$ mg /L⁻¹ para mercurio y entre $2.59 - 3.67$ mg /L⁻¹ para cadmio. Para *Daphnia magna* se estimaron entre $0.04 - 0.08$ mg /L⁻¹ de mercurio y de $0.45 - 0.77$ mg /L⁻¹ para el cadmio. El estudio concluye en que el mercurio resultó más tóxico que el cadmio y que el cladócero es más sensible que el oligoqueto.

Por su parte, Gama (2001), determinó una CL_{50} para el rotífero bentónico, *Euchlanis dilatata* de $0.88-10.66$ mg /L con el insecticida órgano fosforado, paratión metílico. En el caso de los metales pesados mercurio y cadmio los rotíferos litorales, *B. calyciflorus* y *B. patulus* presentaron un rango de tolerancia de 0.1 y 0.5 mg /L demostrando que son mas sensibles al mercurio que al cadmio (Sarma, et al., 2000).

Por lo que las especies de rotíferos litorales antes mencionadas, son más sensibles que las especies pelágicas.

Como se observó, los resultados de esta investigación coinciden con los señalados anteriormente. La toxicidad aguda es más intensa con mercurio que con el cadmio y el cladóceros *Alona rectangula* es muy sensible a ambos tóxicos.

Por otra parte, las concentraciones letales medias registradas en este estudio, son de particular relevancia ya que se han reportado valores de 0.04 – 0.80 mg/kg de cadmio en sedimentos de algunos cuerpos de agua (Merian, 1991) lo cual significa que la comunidad asociada al sedimento está expuesta frecuentemente a toxicidades agudas con efectos potencialmente catastróficos para las poblaciones.

Ahora bien, estas cantidades de tóxicos serán bioacumuladas por algunos organismos (Travieso, *et al.*, 1999), inhibiendo sistemas enzimáticos y afectando con esto, procesos bioquímicos y fisiológicos (Atwell, *et al.*, 1998, González, *et al.*, 1998, Travieso, *et al.*, 1999). Esto ocurre al estar en contacto con el tóxico por un tiempo prolongado. Gama (2000) mostró que la especie litoral *Euchlanis dilatata* (Koste, 1978) es más sensible que otros organismos pelágicos del género *Brachionus*. También los cladóceros litorales son más sensibles al mercurio que los organismos pelágicos como *Daphnia magna* (Fargosova, 1994).

Toxicidad crónica

Estimar la concentración de alimento que se le suministrará a una población es vital ya sea en condiciones de laboratorio o en un ambiente natural, (contaminado por actividades antropogénicas). Se sabe que en condiciones de laboratorio el tipo de alimento modifica la sensibilidad del metal, ya sea en toxicidad aguda o crónica (Martínez, A., 1994). Por lo anterior, se administró *Chlorella vulgaris* que es una microalga muy utilizada debido a su gran cantidad de nutrientes que provee a los individuos (Sarma, *et al.*, 2001). También se ha encontrado que la reducción del crecimiento somático de una población en contacto con un contaminante, es resultado de la cantidad de alimento disponible (Sarma, *et al.*, 2000).

Por lo anterior se tomaron dos densidades de alimento 0.5 y 2×10^6 céls /ml⁻¹.

El grupo testigo, con una alimentación de 0.5×10^6 céls /ml⁻¹ de *Chorella vulgaris*, incrementó su población de manera rápida, y en el día 15 decayó paulatinamente debido a que estos individuos al tener en su medio poco alimento, dedican su energía únicamente a reproducirse, por lo que para el día 11, alcanzaron una densidad máxima promedio de 455 individuos (Figura 4).

Sin embargo los individuos del grupo testigo que se les alimento con 2.0×10^6 células /ml⁻¹ de *C. vulgaris*, incrementaron paulatinamente su población, hasta alcanzar en el día 20 una densidad máxima de 1700 individuos, posteriormente decayeron lentamente (Figura 5). Esto se debe a que al tener mayor cantidad de comida en su medio su energía la concentran para aumentar su masa corporal y después para reproducirse (Lampert y Sommer, 1997), en otras palabras, la concentración de alimento es un factor que puede influenciar negativamente en la sobre vivencia y reproducción en pruebas crónicas (Martínez, *et al.*, 1994 (b)). El decremento del grupo testigo es debido a que el sistema alcanza rápidamente su capacidad de carga muriendo muchos individuos por inanición, obteniéndose muchas generaciones de individuos en menos tiempo.

En el **crecimiento poblacional** con **cadmio** en una densidad de alimento de 0.5 y 2×10^6 céls /ml⁻¹ de *Chlorella vulgaris*, las concentraciones más bajas de tóxico (0.05 , 0.105 y 0.21 mg /L⁻¹), se comportan de manera similar. Existe reproducción rápida, sin embargo no se alcanza una buena densidad, esto es debido a que al estar en contacto con el tóxico, la población se encuentra en estrés y posiblemente deriva más energía para contrarrestarlo que para aspectos reproductivos por lo que no puede aumentar su densidad (Figura 4 y 5) . En el caso de los individuos expuestos a las concentraciones de tóxico más altas, a los cuáles se alimentó con 0.5×10^6 céls /ml⁻¹ alcanzaron una densidad máxima promedio de 300 individuos (Figura 4), sin embargo en las mismas concentraciones, a las cuáles se les alimentó con 2×10^6 céls /ml⁻¹ alcanzaron una densidad máxima promedio de 700 individuos (Figura 5). Esto se debe, a que con una mayor concentración de *Chlorella vulgaris* el tóxico se encuentra menos disponible, ya que las células de las microalgas plausiblemente son capaces de fijar moléculas de metales pesados, como menciona Travieso en (1999). Con una mayor



U.N.A.M. FES
IZTACALA

concentración de algas los individuos tienen una mayor asimilación de nutrientes y mayor resistencia a los efectos de los tóxicos, ya que las algas también tienen la capacidad de reducir los efectos tóxicos de los metales pesados (Cañizares-Villanueva, *et al*, 1999, Cechine y Snell, 1999). Además las algas son capaces de detoxificar el medio de metales pesados (Gotsis, 1982; Hawkins y Griffiths, 1987). Por otra parte Gama y colaboradores, 2001 muestran, como el metil paration mitiga su toxicidad cuando al rotífero *Euchlanis dilatata* se le administra la concentración más alta de *Chlorella* (2×10^6 céls /ml⁻¹).

IZT.

Con respecto al crecimiento poblacional, en los individuos expuestos a mercurio, y a los que se dio la concentración más baja de alimento (0.5×10^6 céls /ml⁻¹), se observó que para las dos concentraciones más altas de tóxico (0.0107 , 0.0053 mg /L⁻¹), no aumentaron mucho su densidad poblacional debido a la toxicidad del metal y murieron rápidamente (Figura 4). En otras palabras al estar en contacto con el tóxico, la población se encuentra en estrés e invierte energía en la reproducción por lo que aumentó la población inmediatamente, sin embargo al no tener suficiente alimento en su medio, la población no pudo recuperarse.

Para las 4 concentraciones siguientes (0.00033 , 0.00066 , 0.0013 y 0.0026 mg /L⁻¹), a las cuáles se les administraron 0.5×10^6 céls /ml⁻¹, adquirieron una mayor densidad máxima promedio comparada con la observada en los individuos a los que se administraron 2×10^6 céls /ml⁻¹ de *Chlorella*, ya que la concentración más baja de alimento alcanza una densidad máxima promedio de 400 individuos, sin embargo para las mismas concentraciones de tóxico a las cuáles se les dio la concentración más alta de *Chlorella*, alcanzan una densidad máxima promedio de 200 individuos, esto se debe a que los individuos a los que se administró la concentración más alta de alimento se encuentran tan intoxicados por el metal, que se afecta entre otros aspectos, su capacidad de filtración (28.4 mg/L) (Dodson y Frey, 1991) (Figura 4 y 5). Esto es ocasionado porque el efecto tóxico-alimenticio es doblemente negativo, debido a la gran toxicidad que presenta el mercurio, el cuál resultó 80 veces más tóxico que el cadmio.

Esto es apoyado por Martínez y colaboradores, 1994 (b)), ya que ellos encuentran que una concentración de 10 mg /L de *Chlorella*, inhibe el crecimiento

poblacional de *Daphnia magna*, acordando que la concentración alimenticia es un factor negativo que influye en la sobre vivencia y reproducción en pruebas crónicas.

Para los valores de r , la población a la que se le alimentó con la concentración más baja de alimento se obtuvo, un valor (r) de $0.05 \text{ ind/día}^{-1}$ para la concentración de 0.025 mg /L^{-1} de cadmio y para la concentración de $0.0026 \text{ mg /L}^{-1}$ de mercurio, la cuál es diez veces menor a la del cadmio se obtuvo $0.10 \text{ ind/día}^{-1}$. Para la concentración más alta de alimento, se obtuvo un valor (r) de $0.12 \text{ ind/día}^{-1}$ para cadmio, en la concentración de tóxico de 0.025 mg /L^{-1} y $0.06 \text{ ind/día}^{-1}$ para mercurio de la concentración de $0.0026 \text{ mg /L}^{-1}$ (Figura 10 y 11).

CONCLUSIONES

- Debido a que los metales pesados no esenciales tienen un efecto negativo en el crecimiento de las poblaciones, es posible observar con *Alona rectangularis* que el cadmio es 80 veces menos tóxico que el mercurio.
- Los individuos pueden mitigar la toxicidad del cadmio cuando se encuentran con densidades altas de alimento. Debido a la gran toxicidad del mercurio los individuos no pueden mitigar su efecto aún en presencia de altas densidades de alimento.
- Es importante el estudiar un organismo litoral como es *Alona rectangularis*, debido a que este se encuentra más expuesto a los metales pesados que se encuentran sedimentados en el piso y paredes del cuerpo de agua; por lo que se concluye que los individuos litorales pueden ser un mejor indicador biológico. Con lo anterior se sugiere el que se elaboren estudios, no sólo con *Daphnidos* si no con diferentes individuos, ya sea de tipo pelágicos así como con litorales.
- Debido a la gran cantidad de individuos obtenidos para el grupo testigo se observó que *Alona rectangularis* es un organismo que se puede mantener fácilmente y a un bajo costo en el laboratorio, por lo que se sugiere el trabajar más con individuos del género *Alona*.
- Se puede apreciar la importancia de las diferentes densidades utilizadas de alimento, ya que estas son capaces de reducir los efectos tóxicos de los metales pesados.

REFERENCIAS

- American public health association. (1992) Standar metods examination of water and waste water. American public health association, American water works association, Water environmental federation. E.U.
- Anonymous. (1985) Methods of Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms. U.S. Environment Protection Agency EPA/600/4-85/013, Washington, DC.
- Atwell L. (1998) Biomagnification and bioaccumulation of mercury in an arctic marine food web: insights from stable nitrogen isotope analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **55**: 11144-1121.
- Baca R. (2000) The effects of toxicants on planktonic systems: an integrated approach using the analysis of size distributions. *J , Aquat, Eco, Stress and Recovery.* **8**: 95-105.
- Baudo R. (1987) Ecotoxicological testing with *Daphnia*. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* **45**: 461-482.
- Borowitzka, M A., y Borowitzka, L.J. (1988) Micro-algal Biotechnology. Cambridge Univ. Press, London.
- Cañizares, V R., Martínez, J F y Espinosa, Ch F. (2000) Acute toxicity to *Daphnia magna* of effluents containing Cd, Zn, and a mixture Cd-Zn, after metal removal by *Chlorella vulgaris*. *Environ Toxicol* **15**: 160-164.
- Cecchine G., y Snell TW. (1999) Toxicant exposure increases threshold food levels in freshwater rotifer populations. *Environ. Toxicol.* **14**: 523-530.
- Cervantes M., y Gutierrez A. (1996) Cladóceros del Estado de México, aportaciones sobre Biología y Sistemática. Tesis Lic. Biología. Facultad Iztacala UNAM, México D.F.200p.
- Crommentuijn T., Sijm D., Bruijn J., Gyistra R., Wiedman F., Wilfred J., Brock C. (1998) Ecotoxicological threshold levels of a mixture of herbicides (atrazine, diuron and metollachlor) in freshwater microcosms. *Aquat, Ecol,* **32**: 135-152.

- Dodson S., y Frey D. (1991) Cladóceras and other Branchiopoda. Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. Academic Press. Inc. USA. 723-786.
- Fargasova, A. (1994) Toxicity of Metals on *Daphnia magna* and *Tubifex tubifex*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **27**: 210-213.
- Finney, D.J. (1971) Probit Análisis, Impreso Cambridge University, tercera edición, 333.
- Gama, F.J. (2001) Population growth of *Euchlanis dilatata* (rotifera): combined effects of methyl paration and food (*Chlorella vulgaris*). *J. Environ. Sci. Health*, **B36** (1), 43-54.
- Gonzalez, M; Silva, E; Schalscha, F; Alay. (1998) Cadmium and lead in a trophic marine Chain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**: 112-118.
- Gotsis, O. (1982) Combined effects of selenium/mercury and selenium/copper on the cell population of the alga *Dunaliella minuta*. *Mar. Biol.* **71**: 217-222.
- Koste, W. 1978. Rotatoria. Getrunder Borntraeger. Berlin Stuttgart. 673.
- Konigsberg, M. (2000) El sombrerero loco. Revista de la dirección de difusión cultural, Universidad Autónoma Metropolitana, **XIV**, Época II, No. 75.
- Lampert, W. Y Sommer, U. (1997) Limnoecology: The ecology of lakes and streams. Oxford university Press. Printed in the united States of América. 382.
- Lozano, V. (1997) Determinación de la toxicidad de los residuales mediante bioensayos con el crustáceo *Daphnia magna* y semillas de rábanos *Raphanus sativus*. Tesis Lic. Biología. Facultad Iztacala UNAM, México D.F. p160.
- Martínez, J. y García R. (1991) Effect of food concentration on the chronic toxicity of sodium dodecyl sulphate to *Daphnia magna*. *J. Aquat, Ecol, Health* **3**: 247-253.
- Martínez, J. y Gutierrez A. (1991) Fecundity, growth and reproduction of *Moina macrocopa* fed different algae. *Hydrobiol*, **222**: 49-55.
- a) Martínez, J., Villaseñor, R y Espinosa F. 1994. Effect of food type and concentration on the survival, longevity, and reproduction of *Daphnia magna*. *Hydrobiol*, **287**: 207-214.

- b) Martínez, J. y García R. (1994) Effect of food concentration on the chronic toxicity of sodium dodecyl sulphate to *Daphnia magna*. *J. Aquat. Ecol. Health* **3**: 247-253.
- Martínez, J., Espinosa, Ch., Villaseñor, R. (2000) Effect of culture volume and adult density on the neonate production of *Daphnia magna*, as a test organism for aquatic toxicity tests. *Environ. Toxicol.* **15**: 155-159.
- Merian, E. (1991) Metals and their compounds in the environment. Verlagsgesellschaft: Weinheim, Germany.
- Negrea, S., Botnariuc, N., Dumont, H. (1999) Phylogeny, evolution and classification of the Branchiopoda (Crustacea). *Hydrobiol.* **412**: 191-212.
- Nelson, S., y Roline, R. (1998) Evaluation of the sensitivity of rapid toxicity tests relative to Daphnid acute lethality tests. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**: 292-299.
- Peters RH (1987). *Daphnia* culture. In RH Peters & De Bernardi R (Eds.) "*Daphnia*" Memorie dell'Istituto Italiano Idrobiologia. **45**: 483-495.
- Persoone, G. y Janssen, R. (1993) Capítulo IV Freshwater invertebrate toxicity tests. pps 51-62, En Handbook of ecotoxicology. Edit. Peter Calow, **1**: 1-478.
- Pica-Granados, Y., Trujillo, G., Hernández, H. (2000) Bioassay standardization for water quality monitoring in México. *Environ. Toxicol.* **15**: 322-330.
- Reynoldson, T. y Zarull, M. (1989) The biological assessment of contaminated sediments __ The Detroit river example. *Hidrobiol.* **188/189**: 463-476.
- Rico, R., Pérez, L y Quintero, D., Rodríguez, M., Hernández, R y Zaragoza, A. (1998) Effects of Koper addition to laboratory maintained microcosms of Presidente Calles reservoir organisms (Aguascalientes, México). *Aquat. Ecosyst. Health Manage.* **1**:(3-4): 323-332.
- Rosales, H., y Carranza, E. (1998) Heavy metals in sediments from Coatzacoalcos river, México. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**: 553-561.
- Sarma, S.S., Nandini, S y Araiza, M.A.F. 1998. Effect of methyl parathion-treated prey (*brachionus calyciflorus*) on the population growth of the predator *Asplanchna sieboldi* (Rotifera). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **61**: 135-142.

- Sarma, S.S., y Nandini, S. (1999) International workshop on zooplankton ecotoxicology, UNAM, Facultad de estudios superiores Iztacala, México.
- Sarma, S. (2000) International workshop on rotifer ecotoxicology, vol. VIII UNAM. Facultad de estudios superiores Iztacala, México.
- Sarma, S., Perez, R., Nandini, S. (2000) Comparison of the Sensitivity of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (rotifera) to selected heavy metals under low and high food (*Chlorella vulgaris*) levels, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **64**: 735-739.
- Socal, R., y Rohlf, F. (1981) Biometry (2nd edn). W.H. Freeman and Company, San Francisco. 859.
- Travieso, L., Cañizares, O., Borja, F., Benitez, A. Dominguez, R., Dupeytrón, R., Valiente, V. (1999) Heavy metal removal by microalgae, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **62**: 144-151.
- Vanegas, C., Espina, S., Botello, V., Villanueva, S. (1997) Acute toxicity and synergism of Cadmium and Zinc in white shrimp, *Penaeus setiferus*, juveniles. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **58**: 87-92.
- Wogram, J., y Liess, M. (2001) Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **67**: 360-367.

ANEXO

ANOVA (Bifactoriales)

Alona rectangular

(Densidad Máxima)

| Fuente de variación | df | SS | MS | F |
|---|----|-------------|------------|----------|
| SUBGRUPOS | 13 | 7911266.000 | 608558.92 | |
| Factor A (concentración de alimento) | 1 | 732600.500 | 732600.50 | 78.48*** |
| Factor B (concentración de cadmio) | 6 | 5212904.000 | 868817.33 | 79.7*** |
| A X B (Interacción) | 6 | 1965761.500 | 3276626.92 | 30.0*** |
| entre Subgrupos(error) | 28 | 261384.000 | 9335.14 | |
| TOTAL | 41 | 8172650.000 | | |

(Día de densidad máxima)

| Fuente de variación | df | SS | MS | F |
|---|----|----------|--------|----------|
| SUBGRUPOS | 13 | 2659.643 | 204.59 | |
| Factor A (concentración de alimento) | 1 | 205.928 | 205.93 | 25.14*** |
| Factor B (concentración de cadmio) | 6 | 2310.476 | 385.08 | 40.30*** |
| A X B (Interacción) | 6 | 143.239 | 23.87 | 2.50* |
| entre Subgrupos(error) | 28 | 229.333 | 8.19 | |
| TOTAL | 41 | 2888.976 | | |

(Tasa de crecimiento "r")

| Fuente de variación | df | SS | MS | F |
|---|----|-------|------|----------|
| SUBGRUPOS | 13 | 3.855 | 0.30 | |
| Factor A (concentración de alimento) | 1 | 0.114 | 0.11 | 6.05* |
| Factor B (concentración de cadmio) | 6 | 3.576 | 0.60 | 27.15*** |
| A X B (Interacción) | 6 | 0.165 | 0.03 | 1.25 ns. |
| entre Subgrupos(error) | 28 | 0.527 | 0.02 | |
| TOTAL | 41 | 4.382 | | |

Tabla 1. Se observan las ANOVAS de dos factores realizadas para *Alona rectangular*, donde se puede observar, si existen diferencias significativas entre las dos concentraciones de alimento y las siete distintas concentraciones de cadmio sobre la Densidad máximas, día de Densidad máxima y tasa de crecimiento poblacional. Se presentan los resultados de las pruebas de distribución de F (representadas por *= P< 0.05, **= P< 0.01 y ***= P< 0.001).

Alona rectangular**(Densidad Máxima)**

| Fuente de variación | df | SS | MS | F |
|---|----|------------|-----------|----------|
| SUBGRUPOS | 13 | 611362.875 | 47027.91 | |
| Factor A (concentración de alimento) | 1 | 118614.750 | 118614.75 | 20.62*** |
| Factor B (concentración de mercurio) | 6 | 420397.875 | 70066.31 | 10.44*** |
| A X B (Interacción) | 6 | 72350.250 | 12058.38 | 1.80ns |
| entre Subgrupos(error) | 28 | 161083.375 | 5752.98 | |
| TOTAL | 41 | 772446.250 | | |

(Día de densidad máxima)

| Fuente de variación | df | SS | MS | F |
|---|----|----------|--------|----------|
| SUBGRUPOS | 13 | 1390.976 | 107.00 | |
| Factor A (concentración de alimento) | 1 | 421.167 | 421.17 | 65.51*** |
| Factor B (concentración de mercurio) | 6 | 815.476 | 135.91 | 18.12*** |
| A X B (Interacción) | 6 | 154.333 | 25.72 | 3.43** |
| entre Subgrupos(error) | 28 | 180.000 | 6.43 | |
| TOTAL | 41 | 1570.976 | | |

(Tasa de crecimiento "r")

| Fuente de variación | df | SS | MS | F |
|---|----|-------|------|----------|
| SUBGRUPOS | 13 | 2.212 | 0.17 | |
| Factor A (concentración de alimento) | 1 | 0.280 | 0.28 | 30.95*** |
| Factor B (concentración de mercurio) | 6 | 1.665 | 0.28 | 26.30*** |
| A X B (Interacción) | 6 | 0.267 | 0.04 | 4.21** |
| entre Subgrupos(error) | 28 | 0.253 | 0.01 | |
| TOTAL | 41 | 2.465 | | |

Tabla 2. Se observan las ANOVAS de dos factores realizadas para *Alona rectangular*, donde se puede observar, si existen diferencias significativas entre las dos concentraciones de alimento y las siete distintas concentraciones de mercurio sobre la Densidad máximo crecimiento poblacional. Se presentan los resultados de las pruebas de distribución de F (representadas por *= P< 0.05, **= P< 0.01 y ***= P< 0.001).

MEDIO DE CULTIVO BOLD BASAL (Gama, 2001)

| | Proporción |
|---|---------------------------------------|
| 1.-Nitrato de sodio (NaNO_3) | 250 g/L |
| 2.-Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 75 g/L |
| 3.-Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) | 75 g/L |
| 4.-Fosfato de potasio monobásico (KHPO_4) | 75 g/L |
| 5.-Cloruro de sodio (NaCl) | 25 g/L |
| 6.-EDTA ($\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 50 g + 31 g KOH /L |
| 7.-Sulfato de hierro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 4.98 g + 1 ml H_2SO_4 |
| 8.-Acido bórico (H_3BO_3) | 11.42 g/L |
| 9.-Cloruro de calcio (CaCl_2) | 25 g/L |
| 10.- Elementos traza | |
| • Cloruro de manganeso ($\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 1.44 g/L |
| • Trióxido de molibdeno (MnO_3) | 0.71 g/L |
| • Sulfato de cobre (CuSO_4) | 1.75 g/L |
| • Nitrato de cobalto ($\text{CO}(\text{NO}_3)_2$) | 0.49 g/L |
| • Sulfato de zinc (ZnSO_4) | 8.82 g/L |