



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de la exposición a diversos metales en
la sobrevivencia de Spirostomum intermedium
y Paramecium caudatum.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
ADRIANA MAYANIN MONTES NAVA



DIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA-PABELLO



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.

APOYOS RECIBIDOS

Se agradece el apoyo brindado por el proyecto DGAPA/PAPIME 2005. Clave: EN-213104 “Desarrollo, montaje y validación de prácticas de laboratorio para la enseñanza de la microbiología ambiental”. Así como al subprograma 127 “Apoyo a la investigación básica” de la Facultad de Química de la UNAM.

Además se contó con fondos del presupuesto PAPIME (VMLP-2005)6190-14.

RECONOCIMIENTOS

La presente tesis fue desarrollada en el laboratorio de Microbiología Experimental del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

DEDICATORIA

Con amor, cariño, respeto y admiración a mi hermosa familia: Lalito, Laura y Lito, que siempre han estado conmigo brindándome su amor, ayuda, comprensión y apoyo incondicional, los adoro y les agradezco todo lo que soy. Mil gracias por esta preciosa familia.

Por supuesto también se la dedico con mucho cariño a mis abuelitos: Ernesto † y Licha † (se que están conmigo), José Luis y Mimi, a mi tía Mary. Les agradezco sus cuidados, amor y atención, los quiero mucho.

También a mi tíos: Lidia, Vale y Rufito.

A mi queridas primas Valeria, Yiya y Min, y a todos sus hijos (Lalito, Mary Fer, Dany y Anuar).

AGRADECIMIENTOS

A Lalito, Laura y Lito muchas gracias por todo.

Al Dr. Víctor Manuel Luna-Pabello, por el apoyo brindado durante la realización de mi tesis y también en las revisiones de la escritura.

A la Dra. María Antonieta Aladro y a la Biól. Margarita Reyes, por su valiosa colaboración en la realización de técnicas protozoológicas y por su amor y entrega en la enseñanza de la materia así como también por el tiempo que emplearon en la revisión de este trabajo.

A la M. en C. Adriana Muñoz y al M. en C. Alejandro Gómez por dedicar tiempo a la revisión de este trabajo.

A Paty Castro por su ayuda y enseñanza de las pruebas así como el manejo de los cultivos.

Un agradecimiento especial a René y a los chismosos Benja y Ernestín por ayudarme siempre. Muchas gracias por su apoyo y ayuda tanto académica como recreativa.

A mis queridas, adoradas y locas amigas Yesenia y Fabiolita les agradezco tantos años de amistad, diversión, apoyo y locura. Gracias por estar siempre conmigo.

A José Luis por todas las enseñanzas Gracias.

A mi amiguisísimo Margarino gracias por tu amistad y por todos tus regaños tan acertados.

A Karlita gracias por tu amistad.

CONTENIDO

Lista de tablas	VII
Lista de figuras	VII
Resumen	IX
1. Introducción.	1
2. Marco de referencia	3
2.1 Contaminación ambiental por metales pesados	3
2.2 Generalidades sobre toxicidad	10
2.3 Pruebas de Toxicidad	10
2.4 Pruebas de toxicidad aguda	12
2.5 Características de los bioindicadores de contaminación	12
2.6 Generalidades sobre los protozoos	13
2.7 Aspectos relevantes sobre los ciliados	16
2.8 Efectos que producen los metales pesados en los ciliados	18
3. Justificación	20
4 Hipótesis	21
5. Objetivos y estrategia de trabajo	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos particulares	22
5.3. Estrategia de trabajo	22
6. Etapa experimental 1	24
6.1 Selección y obtención de los ciliados de prueba	24
7. Resultados etapa experimental 1	26
7.1 Clasificación taxonómica de <i>S. intermedium</i>	26
7.2 Caracterización de <i>S. intermedium</i>	26
7.3 Tiempo de duplicación de <i>S. intermedium</i>	34
7.4 Clasificación taxonómica de <i>P. caudatum</i>	37
7.5 Caracterización de <i>P. caudatum</i>	37
7.6 Tiempo de duplicación de <i>P. caudatum</i>	46
8. Etapa experimental 2	47
8.1 Metodología experimental	47
8.1.1 Elaboración de las soluciones de prueba	47
8.1.2 Pruebas de toxicidad	47
9 Resultados etapa experimental 2	49
9.1 Resultados de la evaluación del efecto de Cu, Cd, Zn y Ag en <i>S. intermedium</i>	49
9.1.1 Respuesta de <i>S. intermedium</i> a la presencia de Cu	49
9.1.2 Respuesta de <i>S. intermedium</i> a la presencia de Cd	52

9.1.3 Respuesta de <i>S. intermedium</i> a la presencia de Zn	57
9.1.4 Respuesta de <i>S. intermedium</i> a la presencia de Ag	60
9.2. Resultados de la evaluación del efecto de Cu, Cd, Zn y Ag en <i>P. caudatum</i>	64
9.2.1 Respuesta de <i>P. caudatum</i> a la presencia de Cu	64
9.2.2 Respuesta de <i>P. caudatum</i> a la presencia de Cd	67
9.2.3 Respuesta de <i>P. caudatum</i> a la presencia de Zn	71
9.2.4 Respuesta de <i>P. caudatum</i> a la presencia de Ag	76
10. Discusión	81
10.1 Respuesta de <i>S. intermedium</i> a la exposición a diferentes metales	81
10.2 Respuesta de <i>P. caudatum</i> a la exposición a diferentes metales	82
10.3 Uso potencial de <i>S. intermedium</i> y <i>P. caudatum</i> para evaluar la presencia de metales pesados	83
11. Conclusiones	86
12. Literatura citada	87
13. Anexos	98
Anexo A. Efecto tóxico de Cu, Cd, Zn y Ag en seres humanos	98
Anexo B. Medios de cultivo	105
Anexo C. Técnicas de adhesión y tinción	106

Lista de tablas

Tabla 1 Límites máximos permisibles para Cu, Cd y Zn establecidos en la NOM-001- SEMARNAT-1996	8
Tabla 2 Propiedades y usos de Cu, Cd, Zn y Ag	9
Tabla 3 Valores de CL ₅₀ y efecto no observable para <i>S. intermedium</i>	64
Tabla 4 CL ₅₀ y Concentración de efecto no observable para <i>P. caudatum</i>	80
Tabla 5 Valores obtenidos para <i>S. intermedium</i> y <i>P. caudatum</i>	80
Tabla 6 Valores de CL ₅₀ (24 horas) para <i>Spirostomum</i> y <i>Paramecium</i>	84

Lista de figuras

Fig. 1 Respuesta biológica a elementos traza esenciales y no esenciales	5
Fig. 2 Variables de respuesta causadas en organismos bioindicadores	13
Fig. 3 Esquema general de un ciliado	17
Fig. 4 Efectos tóxicos causados en organismos bioindicadores	19
Fig. 5 Diagrama de estrategia general de trabajo seguida	23
Fig. 6 Esquema general de <i>Spirsotomum intermedium</i>	27
Fig. 7 Microfotografía de <i>S. intermedium</i>	29
Fig. 8 Microfotografía de <i>S. intermedium</i>	30
Fig. 9 Microfotografía de <i>S. intemedium</i>	31
Fig. 10 Microfotografía de <i>S. intermedium</i>	32
Fig. 11 Microfotografía de <i>S. intermedium</i>	33
Fig. 12 Microfotografías de estructuras encontradas en los cultivos de <i>S. intermedium</i>	34
Fig. 13 Curva de crecimiento de <i>S. intermedium</i>	35
Fig. 14. Fisión transversal de <i>S. intermedium</i>	36
Fig. 15 Esquema general de <i>Paramecium caudatum</i>	39
Fig. 16 Microfotografía de <i>P. caudatum</i>	40
Fig. 17 Microfotografía <i>P. caudatum</i>	40
Fig. 18 Microfotografía de <i>P. caudatum</i>	41
Fig. 19 Microfotografía de <i>P. caudatum</i>	41
Fig. 20 Microfotografía de <i>P. caudatum</i>	42
Fig. 21 Microfotografía de <i>P. caudatum</i>	43
Fig. 22 Microfotografía de <i>P. caudatum</i>	44
Fig. 23 Microfotografía de <i>P. caudatum</i>	45
Fig. 24 Microfotografía de <i>P. caudatum</i>	45
Fig. 25 Curva de crecimiento de <i>P. caudatum</i>	46
Fig. 26 Ejemplo de la disposición de las cajas conteniendo a <i>S. intermedium</i> o <i>P. caudatum</i>	48
Fig. 27 Exposición de <i>S. intermedium</i> a [6 mg/L, 3 mg/L, 1.5 mg/L, 0.75 mg/L, 0.375 mg/L, 0.187 mg/L, 0.093 mg/L, 0.046 mg/L] de Cu	49
Fig. 28 Cambios morfológicos de <i>S. intermedium</i> con [0.0937 mg/L] de Cu	50
Fig. 29 Exposición de <i>S. intermedium</i> a [0.0175 mg/L] de Cu	51
Fig. 30 Exposición de <i>S. intermedium</i> a [0.011mg/L] de Cu	51
Fig. 31 CL ₅₀ de Cu para <i>S. intermedium</i>	52
Fig. 32 Exposición de <i>S. intermedium</i> a [0.4mg/L] de Cd	53

Fig. 33 Exposición de <i>S. intermedium</i> a [0.2 mg/L y 0.1mg/L] de Cd	53
Fig. 34 Exposición de <i>S. intermedium</i> a [0.05 mg/L] de Cd	54
Fig. 35 Exposición de <i>S. intermedium</i> a [0.025 mg/L] de Cd	54
Fig. 36 Exposición de <i>S. intermedium</i> a [0.0125mg/L] de Cd	55
Fig. 37 CL ₅₀ de Cd para <i>S. intermedium</i>	55
Fig. 38 Cambios morfológicos de <i>S. intermedium</i> con [0.4mg/L] de Cd	56
Fig. 39 Exposición de <i>S. intermedium</i> a [20 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, 2.5 mg/L, 1.25 mg/L, 0.625 mg/L, 0.312 mg/L, 0.156 mg/L, 0.039 mg/L, 0.019 mg/L, 0.009 mg/L, 0.004 mg/L] de Zn	57
Fig. 40 Cambios morfológicos de <i>S. intermedium</i> con [0.0046 mg/L] de Zn	58
Fig. 41. Exposición de <i>S. intermedium</i> a [0.0028 mg/L] de Zn	59
Fig. 42 Exposición de <i>S. intermedium</i> a [0.0023 mg/L] de Zn	59
Fig. 43 CL ₅₀ de Zn para <i>S. intermedium</i>	60
Fig. 44 Cambios morfológicos de <i>S. intermedium</i> con [0.312 mg/L] de Ag	61
Fig. 45 Exposición de <i>S. intermedium</i> a [10 mg/L, 5 mg/L, 2.5 mg/L, 1.25 mg/L, 0.625 mg/L, 0.3125 mg/L, 0.1562 mg/L] de Ag	62
Fig. 46 Exposición de <i>S. intermedium</i> a [0.1367 mg/L] de Ag	62
Fig. 47 Exposición de <i>S. intermedium</i> a [0.07812mg/L] de Ag	63
Fig. 48 CL ₅₀ de Ag para <i>S. intermedium</i>	63
Fig. 49 Exposición de <i>P. caudatum</i> a [6 mg/L, 3 mg/L, 1.5 mg/L, 0.75 mg/L, 0.375 mg/L] de Cu	64
Fig. 50 Cambios morfológicos de <i>P. caudatum</i> con [0.375 mg/L] de Cu	65
Fig. 51 Exposición de <i>P. caudatum</i> a [0.20505 mg/L] de Cu	66
Fig. 52 Exposición de <i>P. caudatum</i> a [0.1992] mg/L de Cu	66
Fig. 53 CL ₅₀ de Cu para <i>P. caudatum</i>	67
Fig. 54 Exposición de <i>P. caudatum</i> a [0.4 mg/L,0.2 mg/L y 0.1 mg/L] de Cd	68
Fig. 55 Cambios morfológicos de <i>P. caudatum</i> , con [0.2 mg/L] de Cd	69
Fig. 56 Exposición de <i>P. caudatum</i> a [0.025mg/L] de Cd	70
Fig. 57 CL ₅₀ de Cd para <i>P. caudatum</i>	70
Fig. 58 Exposición de <i>P. caudatum</i> a [20 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, 2.5 mg/L, 1.25 mg/L, 0.625 mg/L, 0.3125 mg/L, 0.1562 mg/L, 0.07812 mg/L, 0.0390 mg/L] de Zn	71
Fig. 59 Exposición de <i>P. caudatum</i> a [0.01953 mg/L] de Zn	72
Fig. 60 Exposición de <i>P. caudatum</i> a [0.0170 mg/L] de Zn	72
Fig. 61 Exposición de <i>P. caudatum</i> a [0.00976 mg/L] de Zn	73
Fig. 62 Cambios morfológicos de <i>P. caudatum</i> con [0.039 mg/L] de Zn	74
Fig. 63 Exposición de <i>P. caudatum</i> a [0.004625 mg/L] de Zn	75
Fig. 64 CL ₅₀ de Zn para <i>P. caudatum</i>	75
Fig. 65 Exposición de <i>P. caudatum</i> a [10 mg/L, 5 mg/L, 2.5 mg/L, 1.25 mg/L, 0.3125 mg/L] de Ag	76
Fig. 66 Exposición de <i>P. caudatum</i> a [0.1367 mg/L] de Ag	77
Fig. 67 Cambios morfológicos de <i>P. caudatum</i> con [0.136 mg/L] de Ag	78
Fig. 68 Exposición de <i>P. caudatum</i> a [0.1171 mg/L] de Ag	79
Fig. 69 CL ₅₀ de Ag para <i>P. caudatum</i>	79

RESUMEN

Los metales pesados son contaminantes cuya presencia en ecosistemas acuáticos puede ocasionar el deterioro de su calidad. Debido a que son no biodegradables, se bioacumulan a lo largo de la cadena trófica con el consecuente daño a las estructuras comunitarias y eventualmente a la salud humana. La principal fuente de metales pesados son las diversas actividades industriales. Tradicionalmente la determinación de los metales pesados presentes en agua, se realiza por espectrofotometría de absorción atómica, la cuál no obstante su rapidez para la detección, resulta un procedimiento económicamente poco accesible para ser usado como método de valoración rutinario. Una alternativa la representa el uso de bioindicadores de metales pesados, por lo que el presente trabajo se enfocó a la realización de pruebas de toxicidad aguda por Cu, Cd, Zn y Ag, empleando como microorganismos de prueba a *Spirostomum intermedium* y *Paramecium caudatum*. Los resultados indican que, en términos de CL₅₀ y concentración de efecto no observable.

S. intermedium presentó mayor sensibilidad a los metales de prueba que *P. caudatum*. Los valores obtenidos de CL₅₀ para *S. intermedium* fueron: 0.01707±0.00047 mg/L de Cu, 0.04014±0.0024 mg/L de Cd, 0.00329±0.00021 mg/L de Zn y 0.1468±0.00054 mg/L de Ag. Los valores del efecto no observable fueron: 0.0117 mg/L de Cu, 0.0125mg/L de Cd, 0.002312 mg/L de Zn y 0.07812 mg/L de Ag, mientras que para *P. caudatum* los valores de CL₅₀ fueron de: 0.3510±0.0102 mg/L de Cu, 0.055±0.001mg/L de Cd, 0.01454±0.00038 mg/L de Zn y 0.1793±0.0017 mg/L de Ag. Los valores del efecto no observable fueron: 0.1992 mg/L de Cu, 0.025 mg/L de Cd, 0.00462 mg/L de Zn y 0.1171 mg/L de Ag. Los resultados indican que la secuencia de toxicidad para *S. intermedium* es de: Zn>Cu>Cd>Ag, mientras que para *P. caudatum* es de: Zn>Cd>Ag>Cu En consecuencia, ambos ciliados pueden ser empleados como bioindicadores de la presencia de metales pesados lo que potencia su uso para medir riesgos ambientales asociados con los efectos tóxicos de metales pesados en cuerpos de agua.

1. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados son elementos no biodegradables que, por su toxicidad, han sido catalogados como contaminantes peligrosos (Martín-González *et al.*, 2005a). La presencia de metales pesados provoca alteraciones en la composición biótica de los ecosistemas, debido a que inducen la desaparición de gran cantidad de especies. Las especies que persisten son únicamente aquellas que resisten parcialmente la presencia de dichos contaminantes, sin embargo, los efectos subletales que les ocasionan, se ven reflejados en cambios en su morfología, histología, fisiología y reproducción (Cervantes y Moreno-Sanchez, 1999).

La mayor fuente de emisión que aporta una gran cantidad de este tipo de contaminantes, es principalmente de origen industrial, (Karvelas *et al.*, 2003; Fernández-Leborans y Novillo, 1995; Madoni, 2000), siendo los ambientes acuáticos uno de los ecosistemas más afectados. Los metales pesados que frecuentemente se encuentran en las descargas finales son Ni, Cu, Cd, Zn, Hg y Cr (Karvelas *et al.*, 2003).

Para evaluar la contaminación química en ambientes acuáticos se han desarrollado numerosas pruebas toxicológicas. Un ejemplo de ellas es la prueba Microtox, la cual se basa en el uso de bacterias luminiscentes (*Vibrio fischeri*), que después de ser activadas son expuestas al tóxico de interés. Como resultado de dicha exposición las bacterias presentan cambios en la actividad metabólica que se traducen en la disminución de la bioluminiscencia conforme aumenta la toxicidad del compuesto en evaluación (Nalecz-Jawecki y Sawicki, 1999). Se han desarrollado otras pruebas empleando algas unicelulares, crustáceos, protozoos y peces, cuyos resultados en general indican una mayor sensibilidad por parte de los protozoos (Twagilimana *et al.*, 1998). Al ser los protozoos organismos eucariontes unicelulares y por su posición dentro de la cadena trófica, pueden ser considerados buenos modelos para predecir los efectos de contaminantes en comunidades acuáticas. Sin embargo, a pesar de la importancia que tienen en todos los ecosistemas, son pocos los trabajos que se han desarrollado para identificar especies que puedan ser

utilizadas como biomonitores (Decamp *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004; Madoni, 2000; Nicolau *et al.*, 2001; Salvadó *et al.*, 1995).

Dentro del grupo de los protozoos, los ciliados, son muy numerosos en ecosistemas acuáticos y terrestres, así como en todos los tipos de tratamiento biológico. Desempeñan un papel importante, ya que mejoran la calidad del efluente, regulan la biomasa bacteriana, disminuyendo la turbiedad del efluente final (Abraham *et al.*, 1997; Decamp *et al.*, 1999; Hoffman y Atlas, 1987; Lee *et al.*, 2004; Madoni *et al.*, 1992, 1994, 1996; Nicolau *et al.*, 2001; Salvadó *et al.*, 1995).

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Contaminación ambiental por metales pesados

La contaminación ambiental, está ampliamente relacionada a las actividades del ser humano. Sin embargo, ha aumentado la frecuencia y gravedad de los incidentes de contaminación en todo el mundo, observándose efectos adversos sobre el ambiente y en la salud humana (Shiny *et al.*, 2005). Al aumentar la cantidad y complejidad de los desechos, estos han rebasado la capacidad de los ecosistemas para asimilarlos y/o degradarlos, lo que ha provocado la acumulación de sustancias en el ambiente, limitando el desarrollo de los seres vivos y disminuyendo la calidad de los ecosistemas.

La contaminación ambiental se define como la alteración desfavorable del entorno, como subproducto total o en gran parte de las actividades humanas a través de los efectos directos o indirectos que se derivan de los cambios en la distribución de energía y en la constitución física y química de la materia (García, 1997). Dichos cambios se deben a la introducción o presencia de sustancias, organismos o formas de energía en ambientes o sustratos a los que no pertenecen o en cantidades superiores a las propias de dichos sustratos, por un tiempo suficiente y bajo condiciones tales, que logran interferir en la salud humana, dañando los recursos naturales o alterando el equilibrio ecológico del lugar en el que se encuentran. La contaminación puede causar efectos adversos muy variados, ya sea sobre los organismos aislados (efectos tóxicos), o sobre los ecosistemas y el equilibrio ambiental en general (efectos ecotóxicos). Dichos efectos pueden ser a corto, mediano o largo plazo y, ocasionalmente, en generaciones posteriores a la que estuvo expuesta al agente (Albert, 1997).

Las fuentes de contaminación antropogénica son las de mayor importancia como causantes de problemas de salud pública, ya que el tipo de contaminantes que emiten son muy variados, pudiendo clasificarse como de tipo industrial, minero, agropecuario, artesanal y doméstico. Cuando uno de estos contaminantes entra al ambiente, su comportamiento dependerá de su composición química, características fisicoquímicas, cantidad y frecuencia de las emisiones, entre otras. Sin embargo, también influyen otros factores como: temperatura, pH, humedad, luz, calor, naturaleza de los organismos presentes en el medio,

y las interacciones de estos con las diferentes sustancias o compuestos existentes (Albert, 1997; Coello *et al.*, 2002; Madoni *et al.*, 1996).

Los ecosistemas acuáticos, tienen la capacidad de autopurificación, gracias a la presencia de microorganismos degradadores, sin embargo, cuando dicha capacidad se agota el cuerpo hídrico se contamina (García *et al.*, 1997). Las vías más comunes de desecho se dan por medio de las aguas residuales. Los efectos de las actividades humanas en los ecosistemas se manifiestan principalmente en los ecosistemas acuáticos: ríos y áreas cercanas a lagos y océanos, donde son descargadas las aguas residuales. Una gran cantidad de productos químicos son introducidos anualmente a los medios acuáticos, entre los que destacan insecticidas, detergentes y metales pesados. Estos últimos merecen particular atención por ser acumulables en el ambiente (García *et al.*, 1997; Karvelas *et al.*, 2003; Manzl *et al.*, 2003; Nicolau *et al.*, 2001; Twagilimana *et al.*, 1998).

Cuando los contaminantes entran en contacto con los ecosistemas acuáticos producen efectos directos e indirectos. Los primeros varían dependiendo de la intensidad y duración de la exposición al tóxico, el cual puede producir efectos letales en algunas especies y no causar daños observables en otras. Además, de manera directa también pueden alterar las interacciones de comunidades consumidoras y productoras, modificando las tasas de descomposición, dinámica del oxígeno y ciclos de nutrientes. Los efectos indirectos de contaminantes pueden inducir a cambios en el comportamiento que alteran las interacciones biológicas intensificando el efecto del contaminante. Por ejemplo, al exponer a compuestos tóxicos de manera simultánea a organismos consumidores y a sus presas, la tasa de depredación se puede ver alterada.

Las influencias indirectas de contaminantes, en la base de la cadena trófica, pueden ser causadas por modificaciones del sustrato orgánico o por cambios en los nutrientes, degradadores y productores primarios, además de que los contaminantes causan enriquecimiento orgánico que disminuye la cantidad de oxígeno y elevan los niveles de nutrimentos (Fleeger *et al.*, 2003).

Para llevar a cabo sus funciones, los organismos vivos requieren de diversos iones inorgánicos esenciales como son Na, K, Mg, Ca, Cl, SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^- . Otros iones, presentes en el ambiente, que son tóxicos y sin actividad biológica, son por ejemplo, los metales pesados. Los metales pesados se definen como aquellos metales con una densidad

mayor a 5g/ml (Cervantes y Moreno-Sanchez, 1999), por ejemplo Au, Pb, Hg, Cd, Ag. También los existen metales esenciales, que resultan tóxicos cuando se encuentran en concentraciones relativamente elevadas, es decir por encima de su concentración umbral, la cual es específica para cada especie y puede depender de la edad, sexo, estado reproductivo y condición fisiológica del organismo. Ejemplos de dichos metales esenciales son Fe, Mg, Cu, Zn (Albert, 1997; Damek-Poprawa y Sawicka-Kapusta, 2003; Lukkari *et al.*, 2005; Maffucci *et al.*, 2005). En la Fig. 1, se observan las posibles respuestas de los metales esenciales, pudiendo ser tóxicos e incluso letales para los organismos si se excede la concentración óptima específica para cada organismo. En el caso de los metales no esenciales, pueden ser tóxicos, acumulables y posteriormente, pueden provocar la muerte de los organismos.

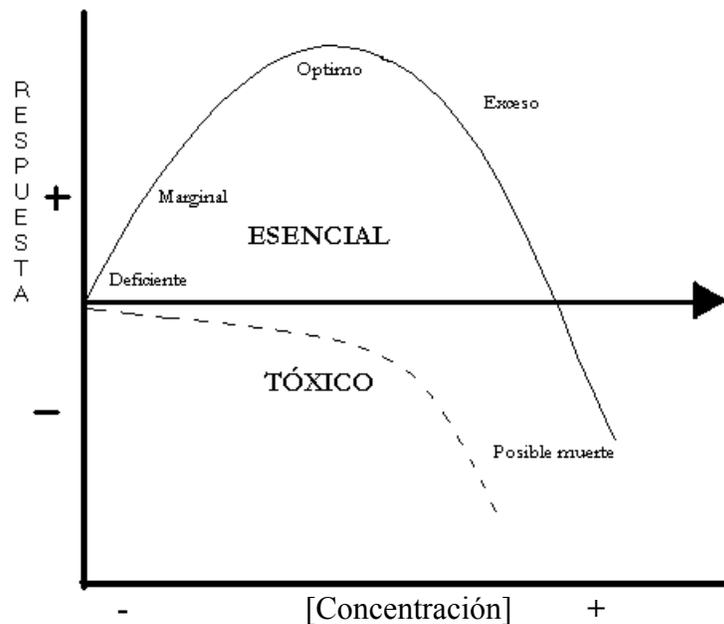


Fig. 1 Respuesta biológica a elementos traza esenciales y no esenciales (- -).

(Tomada de Squibb, 2004)

La contaminación ambiental, ocasionada por dichos metales, está muy altamente relacionada con actividades: mineras, fundidoras, metalúrgicas, entre otras (Karvelas *et al.*, 2003; Karri *et al.*, 2005; Martín-González *et al.*, 2005a y b; Utgikar *et al.*, 2004), donde la mayor parte de las emisiones terminan en las aguas residuales, incluyendo elementos como

Cd, Cu, Zn, Ni y Cr (Karvelas *et al.*, 2003; Madoni, 2000). Posteriormente, estos efluentes finales, al ser descargados en ecosistemas acuáticos provocan la contaminación de ríos, lagos, océanos y suelo. De igual forma, la contaminación también ocurre cuando se lleva a cabo riego con los efluentes finales o al ser vertidos los lodos residuales con fines agrícolas. Si bien, esta agua y lodos, son ricos en materia orgánica, también contienen una gran cantidad de metales pesados, lo que provoca el deterioro en la calidad de los ecosistemas y de la salud humana. Al no ser biodegradables, los metales pesados se acumulan, pudiendo circular en la cadena trófica, y bioacumularse en los organismos ocasionándoles diversos efectos nocivos (Davydova, 2005; Kakkar y Jaffery, 2005; Martín-González *et al.*, 2005a). Por ejemplo, los elementos no esenciales en mamíferos, pueden acumularse en huesos, sistema nervioso, riñones y pulmones, causando la exposición crónica, disfunciones renales, daño al hígado, disminución de la fertilidad en machos, e incremento espontáneo de abortos, además de alterar el metabolismo y los niveles de elementos esenciales, e inclusive pueden llegar a ser teratogénicos y carcinogénicos (Damek-Poprawa y Sawicka-Kapusta, 2003).

Para la mayoría de los organismos la exposición a metales pesados es extremadamente tóxica ya que los iones metálicos suelen penetrar a la célula a través de los mismos sistemas de captación que utilizan los que son fisiológicamente importantes, bloqueando grupos funcionales importantes como: enzimas, polinucleótidos, sistemas de transporte de nutrientes e iones importantes, sustituyendo iones esenciales de sitios celulares (Kakkar *et al.*, 2005). La toxicidad de metales pesados en los organismos acuáticos están influidos por factores fisicoquímicos y biológicos, así como por el tiempo de exposición y concentración del metal o los metales.

La toxicidad de los metales esta en función de:

- ◆ Forma química del metal
- ◆ Concentración
- ◆ Periodo de exposición
- ◆ Presencia de otros metales
- ◆ Factores abióticos: Temperatura, pH, oxígeno disuelto, luz, salinidad.
- ◆ Otros factores ambientales. Tales como la densidad de la población, por ejemplo en microalgas y protozoos, al aumentar la densidad poblacional disminuye la toxicidad

del metal. De igual forma ocurre con la edad del cultivo ya que la toxicidad es mayor en la fase logarítmica de crecimiento que en la fase estacionaria (Albert, 1997; Cervantes y Moreno-Sanchez, 1999; Kakkar y Jaffery, 2005; Mandoni *et al.*, 1996).

En general, por la contaminación con metales pesados desaparecen muchas especies, conduciendo a que predominen aquellas que son resistentes a los agentes contaminantes. Así mismo, la variabilidad de respuestas de los organismos por intervención de los factores físico-químicos dificulta la determinación de concentraciones letales o subletales de los metales pesados. Los efectos subletales de los metales pesados, en una gran variedad de organismos, conducen a cambios en su morfología o histología, mientras que los efectos tóxicos, a nivel celular y molecular se relacionan principalmente con su interacción con los grupos sulfhidrilos de las proteínas, su acción ionofórica, la cual impide el mantenimiento de los gradientes iónicos, al desplazar el calcio de las bombas Na/K y también generan radicales libres. A nivel subcelular, los principales sitios de acción de dichos metales son las mitocondrias, la membrana plasmática y el citoesqueleto. Por lo que este tipo de contaminación altera la composición de las poblaciones de un determinado ecosistema, ya que cada especie responde de manera diferente a las concentraciones de contaminantes y, por tanto, acumula en mayor o menor medida determinados metales (Cervantes y Moreno-Sanchez, 1999; Fisher y Hook, 2002).

Los metales seleccionados para la realización de este trabajo son Cu, Cd, Zn y Ag, debido a que se encuentran frecuentemente en efluentes de plantas de tratamiento (Karvelas *et al.*, 2003; Madoni *et al.*, 1992, 1994, 1996). Asimismo, se ha reportado que el Zn es el metal más abundante en lodos y aguas residuales, así como también en los tanques de sedimentación primaria y secundaria de plantas de tratamiento de residuos domésticos e industriales. En contraste, el Cd, es el que se presenta con menor abundancia en los sistemas de tratamiento. El Cu, presenta abundancia intermedia, por lo tanto, los metales seleccionados, son metales que se encuentran en mayor, mediana y poca abundancia en las aguas residuales (Karvelas *et al.*, 2003; Mantis *et al.*, 2005). De manera complementaria, se ha reportado que el Cd, es uno de los metales más tóxicos para las comunidades microbianas que habitan los lodos activados de las plantas de tratamiento (Madoni *et al.*, 1996), sin embargo, otros estudios, han reportado que el Cd, resultó menos tóxicos que

elementos esenciales como el Cu y Zn. Lo anterior se debe a que cada especie empleada como organismo de prueba presenta diferente sensibilidad a un determinado tóxico (Madoni *et al.*, 1992, 1994; Madoni 2000; Nicolau *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta que de los estudios realizados, no permiten inferir cuál, comparativamente, es el metal más tóxico, se seleccionó a *Spirostomum intermedium* y *Paramecium caudatum* como organismos de prueba para evaluar la toxicidad de Cu, Cd, Zn y Ag.

La descarga indiscriminada en aguas residuales conteniendo metales pesados, en concentraciones por encima de determinados límites, pueden producir efectos negativos en la salud humana, flora o fauna como ya se mencionó, motivo por el cual, dichas descargas son sujetas de sanción en México. La NOM-001-SEMARNAT 1996, es una norma oficial mexicana la cual establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales y bienes nacionales.

Es importante destacar que el Cu, Cd y Zn, están considerados como contaminantes en la NOM-001-SEMARNAT-1996, en la cual indican los valores aceptables para la descarga de cada uno de ellos (Tabla 1).

Tabla 1. Límites máximos permisibles para Cu, Cd y Zn establecidos en la NOM-001-SEMARNAT-1996.

PARAMETROS (miligramos/litro)	RIOS						EMBALSES NATURALES Y ARTIFICIALES				AGUAS COSTERAS					
	Uso en riego agrícola		Uso publico urbano		Protección de vida acuática		Uso en riego agrícola		Uso publico urbano		Explotación pesquera, navegación y otros recursos		Recreación		Estuarios	
	PM	PD	PM	PD	PM	PD	PM	PD	PM	PD	PM	PD	PM	PD	PM	PD
Cd	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2
Cu	4	6	4	6	4	6	4	6	4	6	4	6	4	6	4	6
Zn	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20

PM= promedio mensual. PD= promedio diario

Cabe señalar que el elemento Ag no esta considerado en la NOM-001- SEMARNAT-1996, no obstante constituye un elemento de interés específico por su relativa abundancia en México, además de que este elemento ha sido empleado como desinfectante, siendo escasa

la bibliografía para evaluar sus efectos tanto en humanos como en microorganismos. Por lo tanto, en este trabajo, se realizaron pruebas de toxicidad con dos elementos esenciales y dos no esenciales. En la tabla 2, se muestran las propiedades y usos de los cuatro metales.

Tabla 2. Propiedades y usos de Cu, Cd, Zn y Ag.

Nombre	Símbolo	Peso atómico	Número atómico	Densidad	Punto de fusión °C	Punto de ebullición °C	Usos
Cobre	Cu	63.54	29	8.9	1083	2595	Producción de equipo eléctrico, equipos dentales, dispositivos intrauterinos, cosméticos, maquinaria y en construcción. Componente de aleaciones con Ag, Cd, Sn y Zn. Las sales de Cu han sido empleadas como pesticidas (Gaetke y Kuang, 2003; Friberg <i>et al.</i> , 1990).
Cadmio	Cd	112.4	48	8.6	320.9	765	En numerosos procesos industriales, para partes de automóviles y armas. Para estabilizar plásticos, aleaciones de Cu-Cd, electrodos en baterías alcalinas, soldadura de Ag y en soldadura de electrodos (Friberg <i>et al.</i> , 1990; Martins <i>et al.</i> , 2004).
Zinc	Zn	65.4	30	7.14	420	906	Producción de aleaciones no corrosivas, latón, acero galvanizado y productos de hierro, los productos galvanizados son empleados para construcción, partes de automóviles y utensilios de cocina. Compuestos orgánicos, son utilizados como pesticidas (Friberg <i>et al.</i> , 1990; Martins <i>et al.</i> , 2004)
Plata	Ag	47	107.9	10.5	960.8	2212	Producción de moneda, joyería y cubiertos. Aleaciones y soldadura con Cu, Cd y Pb. Procesos fotográficos, manufactura de aparatos eléctricos, en odontología, tratamiento para quemados. Con el Cu se utiliza en: fabricación de material de laboratorio, resistencias eléctricas. Sales de Ag se usan como desinfectantes de agua para beber y como agentes profilácticos contra gonorrea en los recién nacidos. Para desinfectar agua se emplea en concentraciones de 40 a 200 µg/L y a 250 µg/L es germicida de bacterias gram positivas y negativas (Friberg <i>et al.</i> , 1990)

2.2 Generalidades sobre toxicidad

La toxicidad se refiere a los efectos adversos que causan en un organismo los contaminantes, la toxicidad es el resultante de la concentración, tiempo de exposición y frecuencia del tóxico, así como su relación con el ciclo de vida del organismo (APHA, 1998; Castillo, 2004). Una rama de conocimiento relacionada con la toxicología es la llamada ecotoxicología, la cuál estudia y analiza los efectos de agentes químicos y físicos sobre organismos vivos, con particular atención a poblaciones y comunidades de ecosistemas definidos.

La toxicología aplicada tiene como objetivo el desarrollo de protocolos de ensayos para ser utilizados como herramientas de predicción tempranas que permitan definir umbrales permisibles y sirvan de guía para las entidades reguladoras para la toma de decisiones (Castillo, 2004; García *et al.*, 1997). La investigación ecotoxicológica, de ambientes contaminados requiere un acercamiento interdisciplinario en el que se consideren procesos físicos, químicos, biomoleculares, toxicológicos, fisiológicos y ecológicos. Basados en estos ensayos de laboratorio, pueden ser extrapolados al campo, en este sentido los bioensayos juegan un papel importante en este proceso (Castro, 2004). La alta sensibilidad de las pruebas de toxicidad, las hacen considerarlas una herramienta analítica útil, en el control de calidad ambiental (Hernando *et al.*, 2005).

2.3 Pruebas de Toxicidad

Las pruebas de toxicidad o ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones específicas y controladas. El uso de ensayos biológicos puede proporcionar una medida directa y apropiada de toxicidad, para complementar las mediciones fisicoquímicas. Los efectos que producen los agentes contaminantes pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (Castillo, 2004; Hernando *et al.*, 2005). Los efectos pueden manifestarse a

diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades.

Las pruebas de toxicidad consisten básicamente en la exposición de determinados organismos a diferentes concentraciones de contaminantes, por un tiempo determinado para poder medir los efectos biológicos en los organismos (Puig, 2004).

Las pruebas de toxicidad tienen como finalidad:

- ♦ Determinar las condiciones favorables para los organismos
- ♦ Establecer los límites permisibles para los distintos contaminantes tanto en la atmósfera como en ambientes terrestres y acuáticos.
- ♦ Evaluar el impacto de mezclas sobre las comunidades de los ambientes receptores
- ♦ Comparar la sensibilidad de una o más especies a distintos tóxicos bajo diferentes condiciones para el mismo tóxico.

Las pruebas de toxicidad se clasifican de acuerdo a su duración en pruebas de corto mediano o largo plazo, siendo las de corto plazo o agudas las más empleadas en monitoreos de rutina (APHA, 1998).

Para que un organismo pueda ser seleccionado como organismo de prueba se deben tomar en cuenta las siguientes características:

- ♦ Conocimiento de la biología del organismo de prueba, principalmente en lo referente a sus condiciones ambientales de sobrevivencia y hábitos alimentarios.
- ♦ Sensibilidad a los factores bajo consideración.
- ♦ Distribución geográfica
- ♦ Disponibilidad, teniendo en cuenta un tamaño práctico
- ♦ Disponibilidad de los métodos de cultivo para mantener al organismo en el laboratorio y conocer sus requerimientos tanto fisiológicos como nutricionales, y en general las condiciones físicas de alimentación (Castro, 2004).

Siendo ampliamente recomendable el uso de organismos autóctonos, y de sitios que se encuentren libres de contaminación.

2.4 Pruebas de toxicidad aguda

La toxicidad aguda de un agente químico, se refiere a la capacidad de provocar daños sistémicos como resultado de un período corto de exposición (minutos, horas o algunos días) en relación con el periodo de vida del organismo (Hernando *et al.*, 2005; Castillo, 2004; Castro, 2004).

Los términos usados comúnmente para describir la toxicidad aguda son LD₅₀ y la CL₅₀ que se refiere a la dosis letal media y a la concentración letal media respectivamente. Esta última es la concentración o dosis del contaminante que se estima letal para el 50% de los organismos del ensayo y sus límites de confianza (95%), son usualmente derivados de análisis estadístico. Este tipo de pruebas pueden ser consideradas como herramientas analíticas altamente sensibles (Hernando *et al.*, 2005). Existe una dosis por debajo de la cual no se aprecian efectos sobre los organismos de prueba, a este nivel se le denomina umbral, el valor más alto de la dosis para la que no se aprecian efectos, se encuentra un poco por debajo del umbral, y se le denomina nivel de efectos no observables (Albert, 1997; Castro, 2004).

2.5 Características de los bioindicadores de contaminación

Los bioindicadores son aquellos organismos que ayudan a obtener información de un ecosistema y con el uso de esta información tomar decisiones de manejo sobre los sitios contaminados (Castro, 2004). El uso de organismos indicadores de contaminación requiere conocer las condiciones bajo las cuales se espera se encuentren los organismos y los requerimientos de las especies, así como sus adaptaciones para responder a la exposición aguda o crónica de contaminantes. Las investigaciones sobre organismos indicadores de contaminación requieren de una serie de pruebas en el laboratorio que permitan establecer los límites de tolerancia de una especie a una sustancia o mezcla de ellas mediante pruebas de toxicidad que se basan en la observación y análisis de las características ambientales de los sitios en los cuales se detectan con más frecuencia poblaciones de organismos. De acuerdo con Puig (2004) las algas, bacterias, protozoos, macroinvertebrados y peces son los más usados como indicadores de contaminación acuática.

El objetivo de emplear bioindicadores es conocer las interacciones entre las sustancias contaminantes que se encuentran en el ambiente y la biota, pudiéndose observar los efectos a diferentes niveles de organización biológica: a nivel molecular, fisiológico y ecológico. La integración de estos elementos es necesaria para comprender los efectos ecotoxicológicos en ecosistemas contaminados, ya que los cambios a nivel celular influyen parámetros biológicos importantes de poblaciones como: el crecimiento, el desarrollo, la salud y la reproducción (Fent, 2003). Fig.2.

Los bioindicadores pueden ser utilizados en programas de biomonitoreo para:

- ◆ Advertir señales tempranas de algún problema ambiental
- ◆ Identificar causas y efectos entre agentes estresantes y sus respuestas biológicas
- ◆ Evaluar las respuestas integradas de los organismos al estrés ambiental

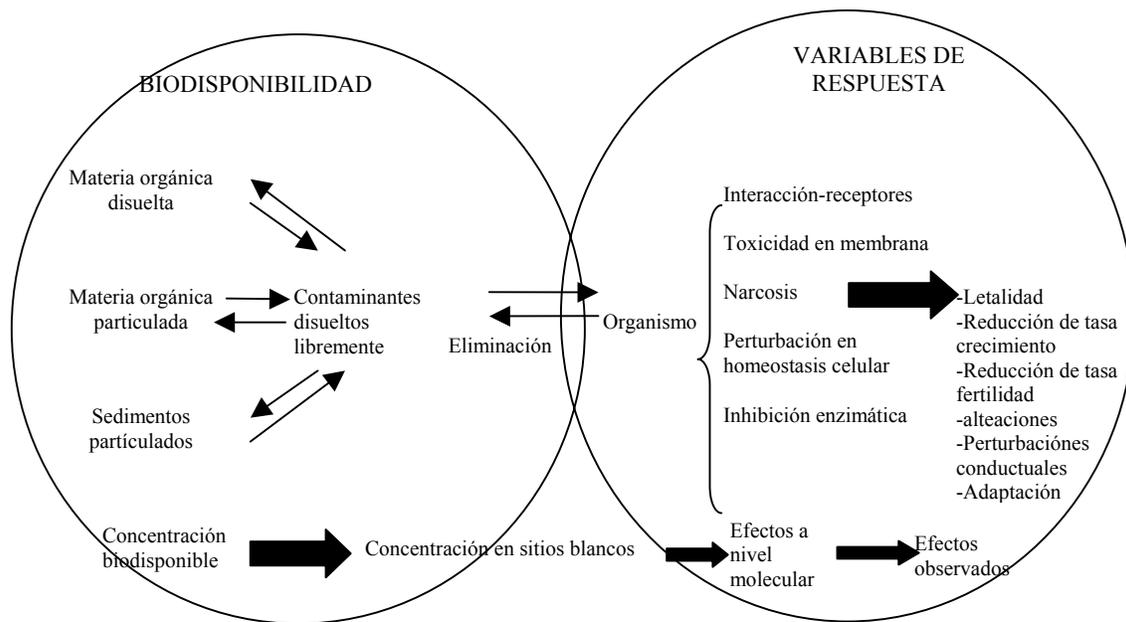


Fig.2. Variables de respuesta causadas en organismos bioindicadores (Modificado de Fent, 2003).

2.6 Generalidades sobre los protozoos

Siendo los protozoos un grupo heterogéneo tan extenso y variado, es difícil mencionar características fundamentales que convengan a todos, ya que su forma es extraordinariamente variada. A manera de descripción, los protozoos son organismos eucariontes unicelulares, que presentan orgánulos en lugar de tejidos u órganos para

desarrollar las funciones vitales. Su tamaño oscila de 10 μm a 3 mm y pueden ser solitarios o coloniales (Laybourn-Parry, 1999; Luna-Pabello *et al.*, 1994; Patterson, 1992). El cuerpo de todos los protozoos está formado de una masa de citoplasma rodeada por una membrana, en cuyo interior se encuentran uno o varios cuerpos que contienen cromatina y son capaces de formar cromosomas, equivalentes a los núcleos de las células de los metazoos. La especialización estructural de su citosoma está más acentuada y presenta mayor diversidad que la de cualquier célula aislada; lo que se explica por el hecho de que tienen que desempeñar por sí misma todas las funciones que un organismo multicelular lleva a cabo a través de diversos órganos y sistemas (Kudo, 1977; López-Ochoterena y Serrano-Limón, 1997; Sleight, 1989).

De acuerdo al tipo de orgánulo que emplean para su desplazamiento, pueden distinguirse tres grupos de protozoos: las amebas, las cuales se desplazan mediante pseudópodos o proyecciones citoplasmáticas, los ciliados que emplean pequeños orgánulos denominados cilios y por último los flagelados, quienes emplean estructuras a manera de látigo o flagelo (Kudo, 1977; Luna-Pabello *et al.*, 1994; Sleight, 1989).

Se les puede encontrar en ambientes tanto acuáticos como terrestres y aéreos, pero preferentemente en aquellos lugares donde existe humedad o por lo menos una película de agua (Laybourn-Parry, 1999; Luna-Pabello *et al.*, 1994; Patterson, 1992). Prácticamente no existe nicho ecológico que no hayan sido colonizados por protozoos, pueden encontrarse en aguas de toda índole, inclusive en aquellas que por su temperatura extrema o peculiar composición química puedan considerarse poco favorables, logran resistir dichas condiciones al formar quistes y pueden exquistarse en respuesta a cambios favorables de los factores ambientales. También están asociados con los más diversos organismos animales incluyendo el hombre (Luna-Pabello *et al.*, 1994; Patterson, 1992; Twagilimana *et al.*, 1998).

Los protozoos presentan diversas ventajas que los hace ser excelentes modelos para estudiar la calidad del agua:

- Distribución cosmopolita ya que su presencia/ausencia refleja el resultado del ambiente fisicoquímico y biológico en el que se encuentra
- Facilidad en el transporte y almacenaje de la muestra
- Relativa facilidad en su cultivo

- Tamaño pequeño
- Ciclo reproductivo corto, permite observar varias generaciones en poco tiempo. (Castro, 2004; García, 1997; Luna-Pabello *et al.*, 1994; Martín-González *et al.*, 2005a y b; Nalecz-Jawecki y Sawicki, 2002; Nicolau *et al.*, 2001)

Los protozoos representan un eslabón muy importante dentro de la cadena alimentaria, el cual se presenta a lo largo del proceso de biodegradación de la materia orgánica que se lleva a cabo en cuerpos de agua natural como aquellos sometidos a tratamiento biológico en plantas. Estos microorganismos son los responsables de disminuir de manera considerable la cantidad de bacterias en suspensión presentes en los líquidos residuales parcialmente tratados, lo cual redundaría en la disminución del grado de turbiedad, debido al efecto depredador y de aglomeración que los protozoos ejercen sobre las bacterias (Boëchat y Adrian, 2005; Lee *et al.*, 2004; Luna-Pabello *et al.*, 1994; Nalecz-Jawecki y Sawicki, 2002; Shiny *et al.*, 2005). Además, ayudan a regular el flujo de sustancias y de energía que se distribuye hacia el siguiente nivel trófico, proporcionando información importante de los daños ecológicos con lo cual es posible predecir el riesgo que representan para los ecosistemas (Fernández-Leborans y Novillo, 1995; Madoni, 2000; Martín-González *et al.*, 2005a; Nicolau *et al.*, 1999), la exposición a estos contaminantes descargados en cuerpos de agua.

La importancia que tiene el estudio de los protozoos se debe a su gran utilidad, como herramientas de laboratorio en estudios fisiológicos, bioquímicos, genéticos, farmacológicos y otros (Aladro *et al.*, 1990; López-Ochoterena y Serrano-Limón, 1997).

Por lo tanto la estructura y nivel funcional de las comunidades pueden ser utilizados en pruebas toxicológicas, analizando aspectos como cambios morfológicos, cambios en el consumo de oxígeno, cambios en la tasa de crecimiento, y en la tasa de consumo de alimento (Nalecz-Jawecki y Sawicki, 2002).

Existen numerosos estudios que relacionan el papel que desempeñan los protozoos ciliados en la depuración de contaminantes orgánicos e inorgánicos, así como de su posición en la cadena trófica por lo anterior se les considera como bioindicadores de la calidad de cuerpos de agua (Curds y Cockburn, 1970; Coello *et al.*, 2002; Coppellotti, 1994; Ekelund *et al.*, 2003; Fernández-Leborans y Novillo, 1993, 1995; García *et al.*, 1997; Nalecz-Jawecki y Sawicki, 1999; Hoffman y Atlas, 1987; Luna-Pabello, 1996; Lee *et al.*, 2004; Madoni *et al.*,

1992, 1994, 1996; Madoni, 2000; Martín-González *et al.*, 2005b; Miyoshi *et al.*, 2003; Nalecz-Jawecki y Sawicki, 2002, 2003; Nicolau *et al.*, 1999; Salvadó *et al.*, 1995; Sekkat *et al.*, 1992; Shiny *et al.*, 2005; Takiguchi *et al.*, 2002; Twagilimana *et al.*, 1998). A pesar de su gran importancia en los ecosistemas acuáticos, pocos trabajos se han realizado con la finalidad de identificar especies útiles en la evaluación de riesgos ambientales provocados por diferentes tipos de contaminantes.

2.7 Aspectos relevantes sobre los ciliados

El phylum Ciliophora incluye a los organismos conocidos como ciliados, esta constituido por un grupo de aproximadamente 8,000 especies (Aladro *et al.*, 1990). Son el grupo más estudiado desde el punto de vista de contaminación de cuerpos de agua tanto naturales como artificiales, particularmente aguas residuales en drenajes domésticos, aguas negras sin tratar y en sistemas de tratamiento biológico (Luna-Pabello *et al.*, 1994).

Los ciliados se caracterizan por la presencia de cilios simples u orgánulos ciliares compuestos, cuando menos en un estado de su ciclo de vida; estos cilios simples o compuestos están distribuidos en diferentes porciones, repartidos en el cuerpo (ciliatura somática) o alrededor de la boca o citostoma (ciliatura oral), teniendo como función la locomoción y la alimentación (Aladro *et al.*, 1990; Castro, 2004; Kudo, 1977; Margulis *et al.*, 1990; Martín-González *et al.*, 2005a y b; Sleight, 1989).

La infraciliatura es universal en los ciliados, localizada debajo de la película y representada por los gránulos basales o cinetosomas, microfilamentos y los microtúbulos asociados. La cinétida esta compuesta por un cinetosoma y cada cilio surge del cinetosoma; la hilera longitudinal de cinétidas se conoce con el nombre de cinetia (Aladro *et al.*, 1990), que coordinan la locomoción (Castro, 2004; Margulis *et al.*, 1990).

Los ciliados tienen generalmente citostoma, variando su posición en los diferentes grupos; puede ser muy simple en su estructura o ser una zona compleja asociada con una cavidad bucal que contiene orgánulos ciliares complejos como la membrana paroral y las membranelas (zona adoral de membranelas).

Los ciliados son heterocariontes debido a que el aparato nuclear está formado por un macronúcleo y un micronúcleo cuyo número puede ser uno o más en ambos casos; el

macronúcleo regula el metabolismo del ciliado, mientras que el micronúcleo está involucrado en su genética y la recombinación sexual.

Es frecuente la presencia de algunos orgánulos como vacuolas contráctiles o vesículas de expulsión del agua; el citoprocto o citopigio por donde descargan los materiales indigeribles (Aladro *et al.*, 1990; Margulis *et al.*, 1990). Fig. 3.

Son heterótrofos y los métodos y preferencias alimentarias muestran un amplio rango de variación, siendo bacterívoros, alguívoros, fungívoros, herbívoros, carnívoros, omnívoros y consumidores de materia orgánica (Aladro *et al.*, 1990).

La reproducción ocurre a través de la fisión binaria. también se reproducen parasexualmente, mediante conjugación, en el que se lleva a cabo el intercambio de micronúcleos (Margulis *et al.*, 1990).

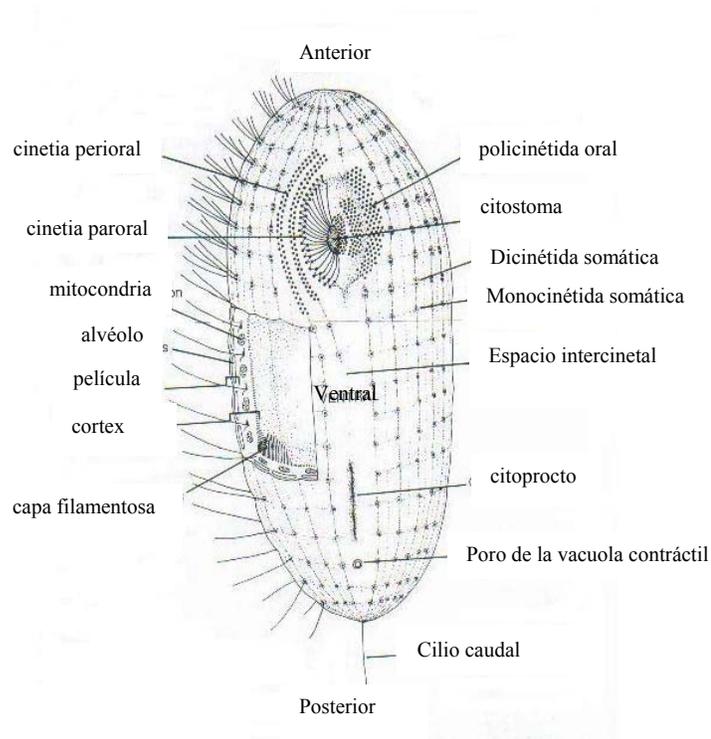


Fig. 3 Morfología general de un ciliado (tomado de Small y Lynn, 1985)

2.8 Efectos que producen los metales pesados en los ciliados

Los metales pesados son tóxicos para los organismos vivos, incluyendo la mayoría de los microorganismos aún a concentraciones moderadas (Nicolau *et al.*, 2001). El impacto de los metales pesados en los microorganismos puede incluir la disminución de la biomasa microbiana y cambios en la estructura de la comunidad microbiana, reducción en la mineralización de carbón y su acumulación en la materia orgánica (Ekelund *et al.*, 2003). La toxicidad producida por metales pesados en ciliados puede inhibir el crecimiento, favorecer su acumulación en gránulos intracelulares, provocar mortalidad, cambios bioquímicos, inhibición de respiración, alteración de relaciones tróficas entre comunidades de ciliados. También inhiben la tasa de ingestión, decrece la biomasa, la diversidad de especies y modifican el equilibrio de las poblaciones, ya que pueden incrementar poblaciones de ciertos ciliados y disminuir otros (Abraham *et al.*, 1997; Fernández-Leborans y Novillo, 1993; Gracia *et al.*, 1994; Salvadó *et al.*, 1995; Hoffman y Atlas, 1987; Madoni, 2000; Martín González *et al.*, 2005 *a, b*; Nicolau *et al.*, 1999, 2001).

Pueden producir diferentes deformaciones: cambios morfológicos tales como acortamiento de la célula, curvatura, deformaciones esféricas, reducir el movimiento y locomoción, provocar lisis (Nalecz-Jawercki y Sawicki, 1999, 2003). Los metales pueden actuar a nivel de membrana o interferir con el citoplasma o funciones nucleares después de entrar a la célula pudiéndose concentrar en la membrana celular y destruir su integridad causando lisis (Madoni, 2000). En la Fig. 4, se muestran los diferentes niveles a los que pueden actuar, deteriorando sus aspectos fisiológicos, morfológicos y conductuales de los protozoos ciliados lo que se traduce en alteraciones a nivel ecológico.

El Cd produce múltiples efectos biológicos a nivel de membrana, estructura mitocondrial y altera sus funciones. El Zn a pesar de ser un micronutriente esencial, también produce alteraciones ultraestructurales (Martín-González *et al.*, 2005a).

Sin embargo, la literatura sobre este tema continua siendo escasa, por lo que es necesario, llevar a cabo gran número de investigaciones acerca del efecto de los metales pesados en los protozoos.

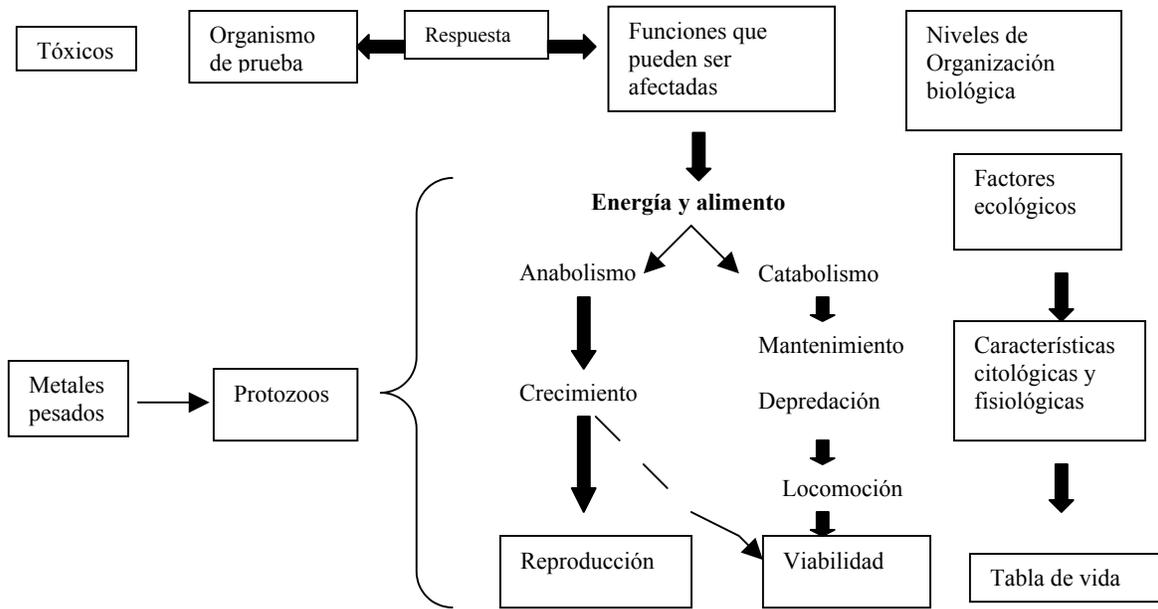


Fig. 4. Diagrama de las funciones básicas que pueden ser alteradas por los metales pesados en los protozoos (Tomado de Nicolau *et al.*, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN

La contaminación ambiental es un grave problema debido a la creciente complejidad y cantidad de desechos antropogénicos que se liberan al ambiente. De manera particular, los metales pesados ocasionan efectos tóxicos en el ambiente y para la salud humana. Asimismo, su presencia en aguas residuales dificulta la depuración biológica, provocando la contaminación de ambientes acuáticos, al ser descargados los efluentes finales de las plantas de tratamiento principalmente de origen industrial. La descarga indiscriminada de aguas residuales conteniendo metales pesados ocasiona alteraciones en el equilibrio ecológico, motivo por el cual dichas descargas son sujetas a sanción en México (NOM-001-SEMARNAT 1996). Con base en lo anterior, se seleccionaron 4 metales a emplear en este trabajo: Cu, Cd, Zn y Ag, debido a que los primeros 3 son elementos que se encuentran frecuentemente en plantas de tratamiento, siendo el Zn el más abundante, seguido por el Cu y finalmente el Cd. En México la NOM-001-SEMARNAT-1996, establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, en donde la concentración máxima permitida para el Cu es de 6.0 mg/L, para el Cd es 0.4 mg/L y para el Zn de 20 mg/L. En el caso de Ag, dicha norma no establece el valor máximo permisible para este elemento, sin embargo es importante el desarrollo de pruebas toxicológicas, ya que este elemento se emplea como desinfectante y sólo se cuenta con datos aislados de sus efectos en cierto tipo de microorganismos. Por lo anterior, es conveniente realizar estudios ecotoxicológicos con Cu, Cd, Zn y Ag empleando a los ciliados *Spirostomum intermedium* y *Paramecium caudatum* para llevar a cabo pruebas de toxicidad, con la finalidad de contribuir al establecimiento de las bases para el desarrollo de una metodología rápida y de bajo costo, basada en el uso de dichos ciliados, para emplearlos como bioindicadores de contaminación.

4. HIPÓTESIS

Se plantea el uso de *Paramecium caudatum* como bioindicador de contaminación por metales pesados, es un ciliado común en los sistemas de tratamiento biológico. Mientras que en los cuerpos de agua naturales y posibles receptores de efluentes finales de plantas de tratamiento (ríos, lagos, etc.), el microorganismo potencialmente útil podría ser *Spirostomum intermedium*. Se ha reportado que estos dos ciliados son sensibles a la presencia de este tipo de contaminantes, en este contexto, se esperaría que *S. intermedium*, presente mayor sensibilidad ante la exposición a los diversos metales que *P. caudatum*. Asimismo, se espera que los metales que presenten menor toxicidad sean el Cu y Zn, debido a que son elementos esenciales. Finalmente se espera que el Cd resulte ser el metal más tóxico para ambos microorganismos y la Ag inferior a la toxicidad del cadmio, pero superior a Cu y Zn, debido a su capacidad desinfectante.

5. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

5.1 Objetivo general

Evaluar la factibilidad de emplear *Spirostomum intermedium* y *Paramecium caudatum* como bioindicadores de presencia de Cu, Cd, Zn y Ag.

5.2 Objetivos particulares

- ♦ Realizar pruebas de toxicidad aguda empleando *S. intermedium* y *P. caudatum* como organismos de prueba para evaluar la presencia de Cu, Cd, Zn y Ag.
- ♦ Determinar el efecto de dichos metales en su sobrevivencia y evaluar su posible uso como bioindicadores.
- ♦ Evaluar el efecto de Cu, Cd, Zn y Ag sobre *S. intermedium* y *P. caudatum*.

5.3 Estrategia de trabajo

Para el desarrollo de este trabajo se llevo a cabo la revisión bibliográfica sobre los principales aspectos relacionados con el tema abordado, entre estos aspectos destacan, contaminación acuática, metales pesados, los ciliados como bioindicadores. Asimismo, se revisaron los procedimientos para la obtención, manejo y mantenimiento de ciliados y los fundamentos sobre pruebas de toxicidad y su aplicación empleando ciliados. Con esta información se elaboró el marco teórico de referencia que permitiera orientar la experimentación, la cual se dividió en: Etapa 1, de experimentación exploratoria y Etapa 2, de experimentación formal. La secuencia de las principales actividades realizadas durante las etapas experimentales 1 y 2 se muestran en la Fig. 5. Ambas etapas experimentales se describen en las siguientes secciones.

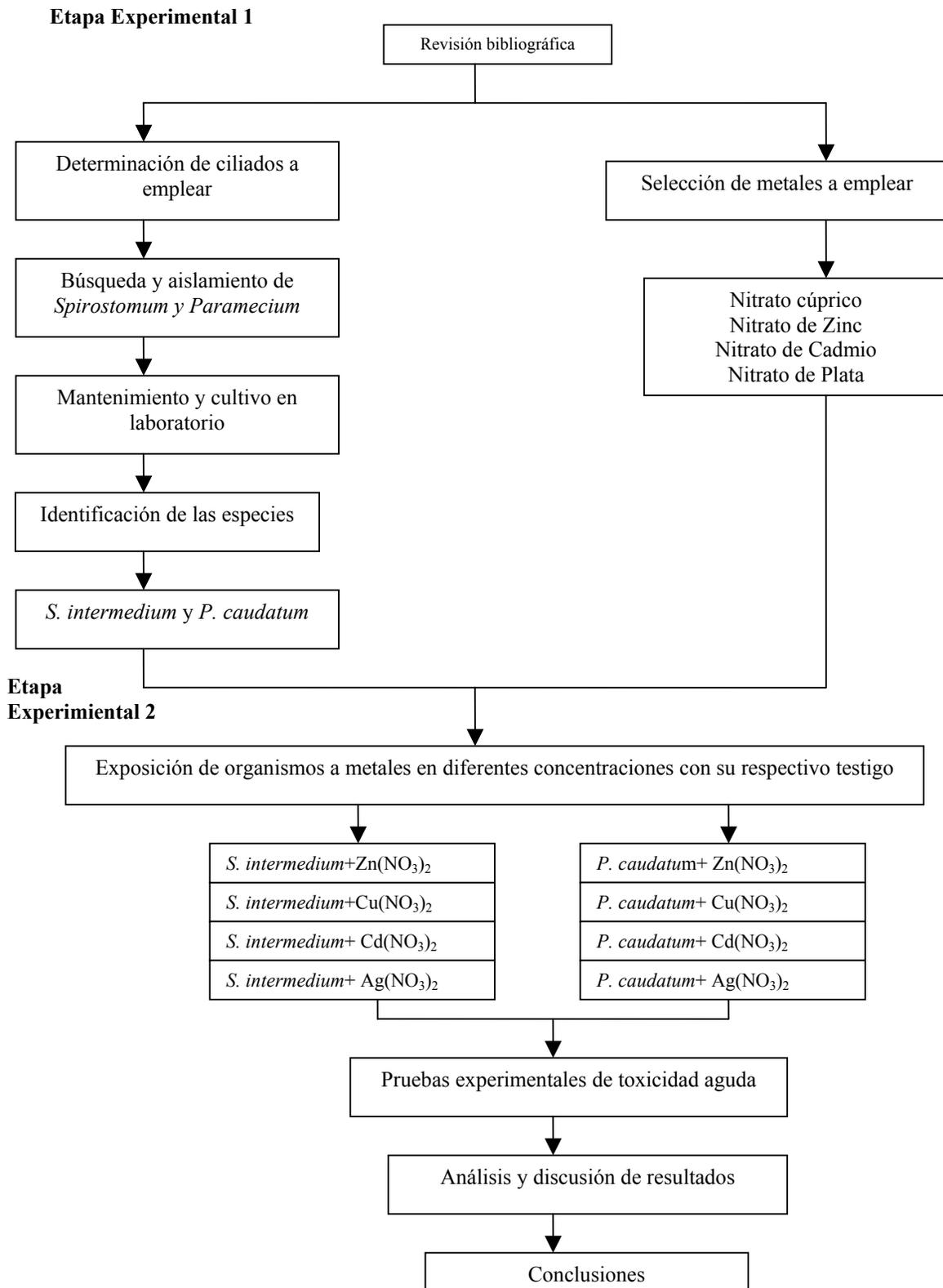


Fig. 5. Diseño experimental utilizado en la evaluación de metales pesados

6. ETAPA EXPERIMENTAL 1

6.1 Selección y obtención de los ciliados de prueba

Esta primera parte de la experimentación consistió inicialmente en la determinación de los ciliados que se emplearían para el desarrollo de las pruebas toxicológicas. Madoni (2000), ha observado que el género *Spirostomum* posee varias cualidades que lo hacen un buen indicador para metales pesados, ya que muestra alta sensibilidad a Ni, Cu, Hg y Zn este autor concluye que *Spirostomum* es un excelente y conveniente indicador para evaluar la toxicidad de aguas contaminadas por metales pesados, ya que bajas concentraciones de sustancias químicas como metales pesados, generalmente inducen a deformidades esféricas, acortamiento y encorvamiento de las células (Twagilimana *et al.*, 1998). Por otra parte Nalecz-Jawecki y Sawicki (2002) emplearon una prueba llamada Spirotox para evaluar la toxicidad de compuestos contaminantes, resultando muy sensible a metales pesados y menos sensible a compuestos orgánicos, por lo que han propuesto que puede ser considerado para incluirlo en una batería de toxicidad (Twagilimana *et al.*, 1998; Nalecz-Jawecki y Sawicki, 2002). En el caso de *Paramecium*, también presenta sensibilidad a ciertos metales pesados (Madoni, 2000), además de que es uno de los ciliados más estudiados. Por estas razones, se decidió elegir a un organismos del género *Spirostomum* y a otro organismo del género *Paramecium*, para llevar a cabo la realización de las pruebas de toxicidad, considerando que son organismos de fácil mantenimiento y no se requiere equipo sofisticado.

Posteriormente se llevo a cabo la búsqueda los ciliados en aguas residuales de la planta de tratamiento, fuentes, charcas de Ciudad Universitaria (CU) y en el jardín Botánico, siguiendo las técnicas de muestreo descritas por López-Ochoterena y Serrano-Limón (1997). Con esta metodología, fue posible encontrar a los dos ciliados que serían empleados en las pruebas de toxicidad. El registro de los ciliados encontrados se llevó a cabo mediante la técnica de campo claro, con el uso de microscopio óptico marca Iroscope con cámara fotográfica y de videograbación, haciendo las observaciones *in vivo*. Para realizar el aislamiento fue necesario trasladar selectivamente organismo por organismo utilizando una pipeta Pasteur con punta delgada (micropipeteo) a una infusión de cebaba a *Spirostomum*, y *Paramecium*, fue trasladado a infusión de lechuga (Anexo B). Una vez que se logro el

aislamiento y el crecimiento poblacional de los dos ciliados por separado, se procedió a ejecutar las primeras tinciones empleando colorantes vitales como rojo neutro y azul violeta. Tinciones permanentes: hematoxilina de Harris, nigrosina-cloruro de mercurio formol (NMF), Klein y la modificación de la técnica de protargol de Silva-Neto (2000) (Anexo C).

7. RESULTADOS ETAPA EXPERIMENTAL 1

De acuerdo a la literatura y a tinciones vitales y permanentes realizadas, se determinó que el organismo cultivado fue *Spirostomum intermedium*

7.1 Clasificación taxonómica de *S. intermedium* de acuerdo a Lynn y Small 2000

Reino: Protozoa Goldfuss

Phylum: Ciliophora Doflein

Subphylum: Postciliodesmatophora Gerassimova & Seravin

Clase: Heterotrichea Stein

Subclase: Heterotrichia Stein

Orden: Heterotrichida Stein

Familia: Spirostomidae Kent

Género: *Spirostomum* Ehrenberg

Especie: *S. intermedium* Kahl

7.2 Caracterización de *S. intermedium*

Es un protozoo ciliado de cuerpo alargado y cilíndrico, altamente contráctil de 300-800 μm de longitud y de 30-50 μm de anchura (Fig. 6 y 7) (Foissner *et al.*, 1991). Ciliatura somática uniforme con cortos cilios ubicados en forma espiral (Fig. 8).

El citostoma (Fig. 8.d y 9) se encuentra ubicado en la parte media del cuerpo, los cilios de las membranelas son adherentes, y su movimiento permite la formación de corrientes que atraen el alimento hacia este. Tiene un número variado de vacuolas digestivas (Fig. 10) para almacenar y digerir el alimento capturado; estas vacuolas se forman sucesivamente en la base de la cavidad bucal. Cuenta con gran cantidad de mionemas independientes a las cinetias, lo que lo hace un organismo altamente contráctil.

El aparato nuclear está constituido por un macronúcleo moniliforme o arrosariado (Fig. 10 y 11) con 8-50 elementos en forma elíptica, cada uno con una longitud de 15-20 μm , y un micronúcleo. Se ha reportado fisión binaria transversal principalmente, y también presentan conjugación (Nikon, 2002). Posee una vacuola contráctil (Fig. 6 y 7) ubicada en la parte

terminal y de tipo lagunar, esta vacuola sirve para mantener el balance hídrico intracelular, porque expulsa con frecuencia el exceso de agua. (Aladro *et al.*, 1990; Jones, 1974).

Está ampliamente distribuido en la naturaleza, tanto en medios salobre y dulceacuícolas normalmente se encuentra en medios no contaminados, con poco movimiento de agua y con materia orgánica en descomposición, es aerofílico, tolera niveles bajos de oxígeno en medios mesosapróbicos, y pH entre 7.4 y 7.6. Se desplaza lentamente, lo cual facilita su observación, es relativamente fácil mantenerlo en el laboratorio bajo condiciones no axénicas (Aladro *et al.*, 1990; Mackinnon y Hawes, 1961), muestra preferencia por sitios profundos, donde la descomposición de celulosa es intensa (Madoni, 2000). Se alimenta de diatomeas, pequeños flagelados y bacterias (Kudo, 1977). Se ha observado que *Spirostomum* forma estructuras esféricas (Fig. 12) asociadas con la hibernación, sin embargo, no se ha vuelto a registrar la observación de dichas estructuras (Ford, 1986; Mackinnon y Hawes, 1961), en este caso parecen estar relacionadas a la alimentación, ya que dichas estructuras, aparecían cuando los cultivos, tenían poca cantidad de materia orgánica, por lo tanto muy poca cantidad de alimento.

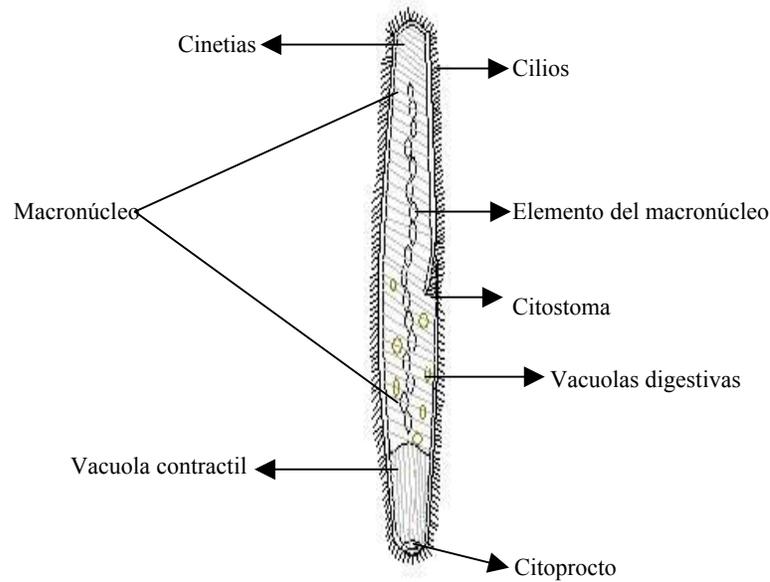


Fig. 6 Morfología general de *Spirostomum intermedium*

Una vez inoculada la infusión de cebada, la cual se mantuvo en una incubadora a 28 °C, con un fotoperíodo de 9 horas de luz por 15 de oscuridad. De esta manera, se logró aislar e identificar al ciliado *Spirostomum intermedium* con el cual se llevaron a cabo los experimentos programados para la segunda etapa experimental. Adicionalmente se realizaron mediciones de organismos en vivo, determinándose que mide 572 µm de longitud y 44 µm de anchura.

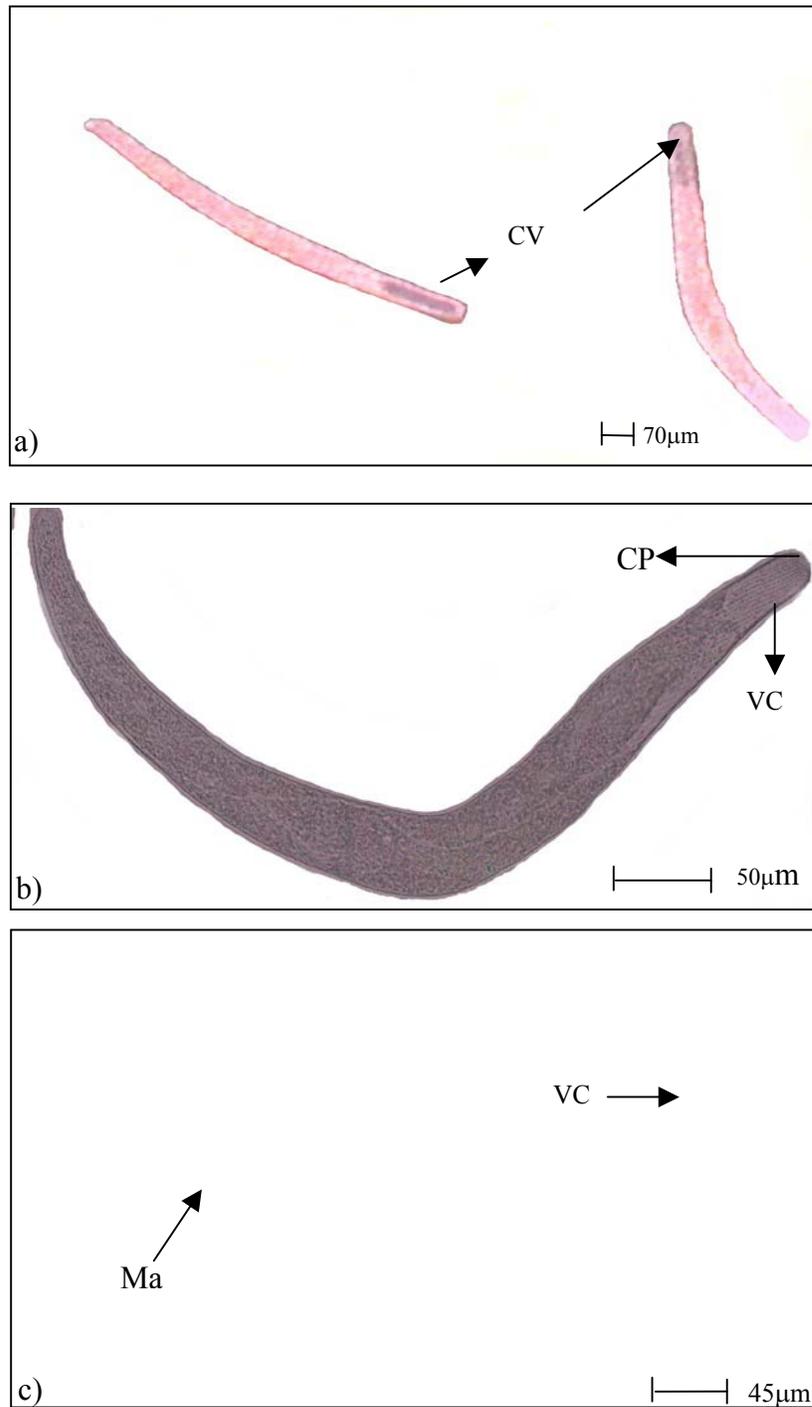


Fig. 7 Microfotografía de *S. intermedium* a) campo claro en vivo 10X b) y c) campo claro en vivo 40 X. VC= Vacuola contráctil. CP=citoprocto. Ma=macronúcleo.

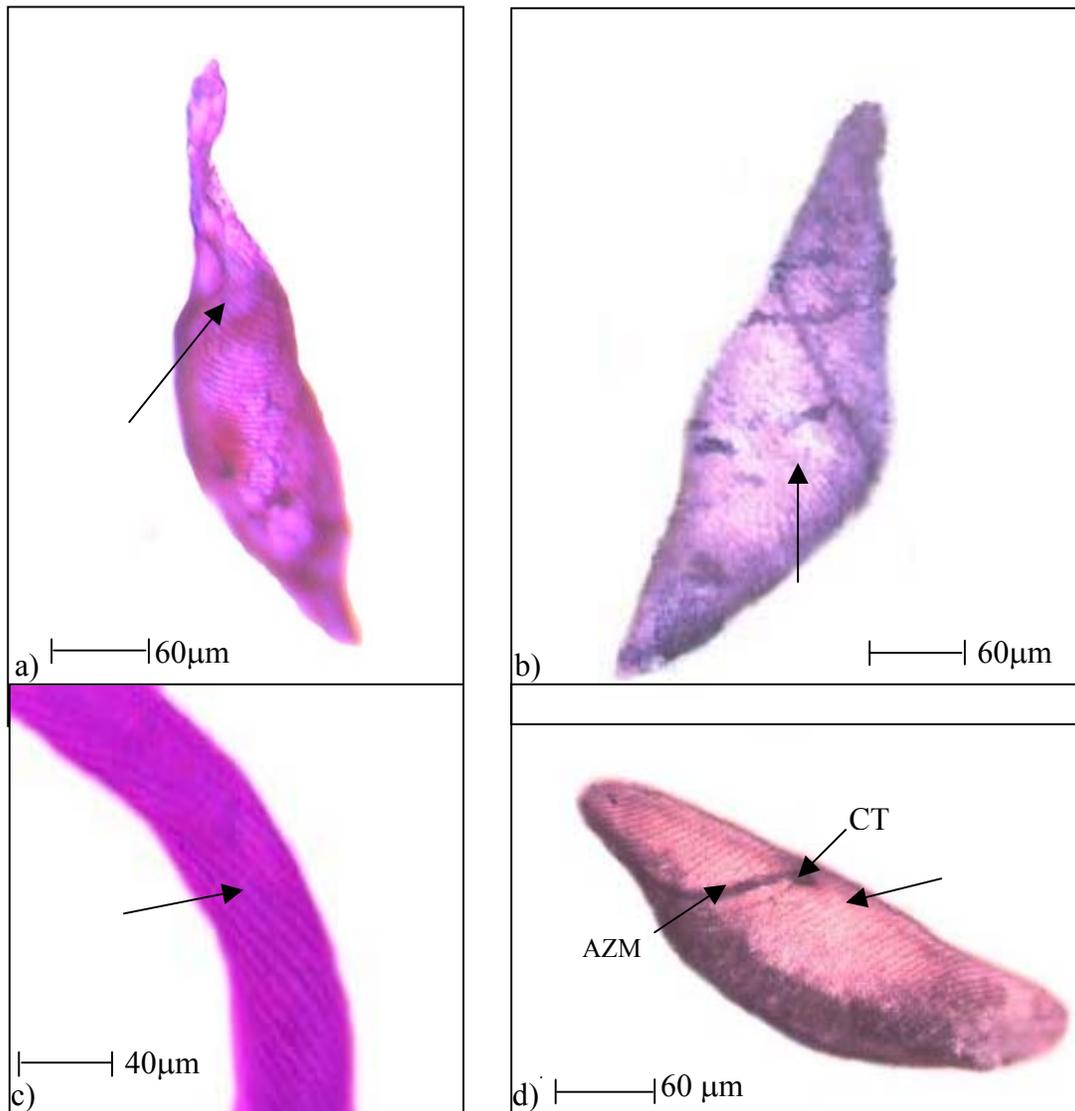


Fig.8 Microfotografía de *S. intermedium*. La flecha indica las cinetias. Tinción NMF a), b) y d) 40 X. c) Tinción azul violeta 40X. AZM=Zona adoral de membranelas. CT= cistoma.

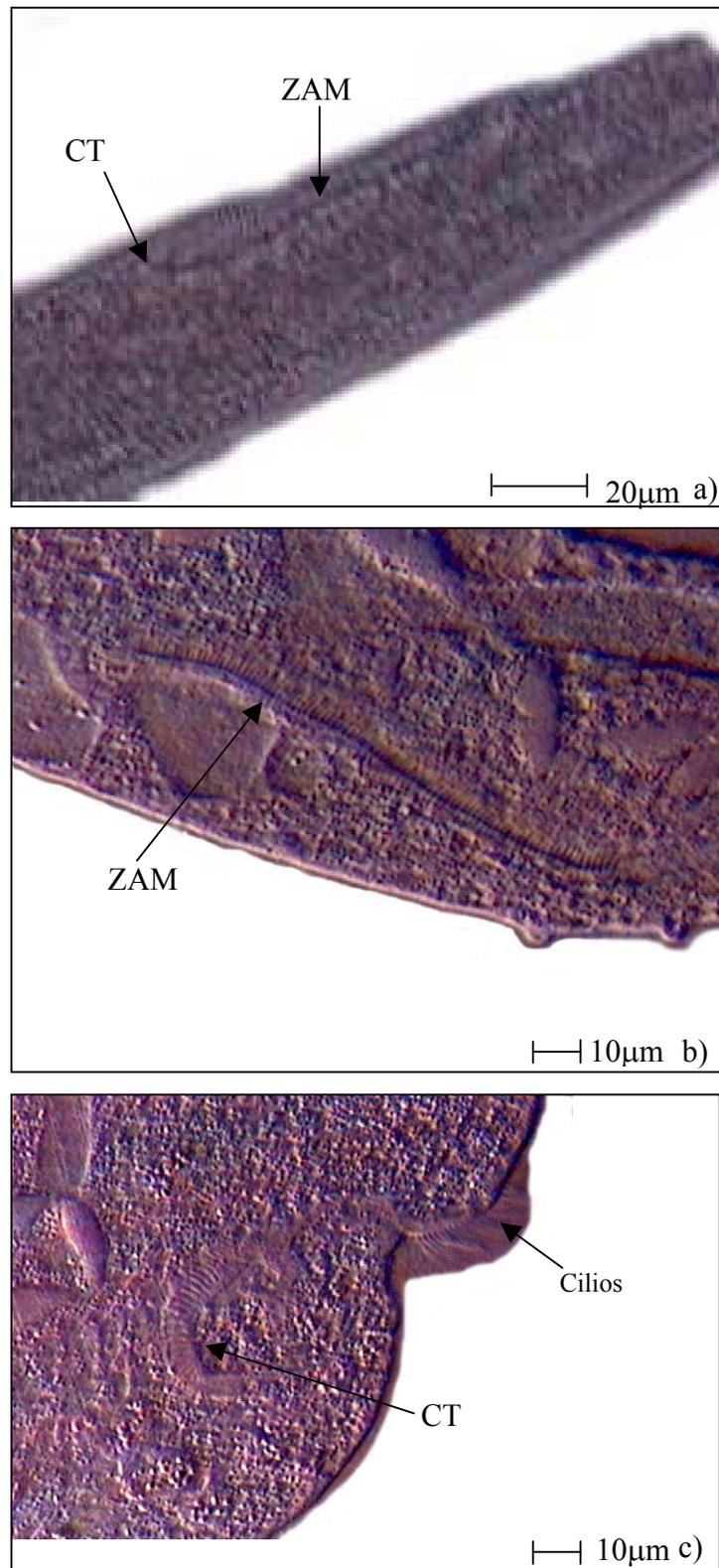


Fig. 9 Microfotografía de *S. intemedium*. a) Zona adoral de membranelas. Campo claro 40X b) Zona adoral de membranelas c) Citostoma contraste diferencial de interfase. b)y c) 100X CT= citostoma. ZAM= Zona adoral de membranelas.

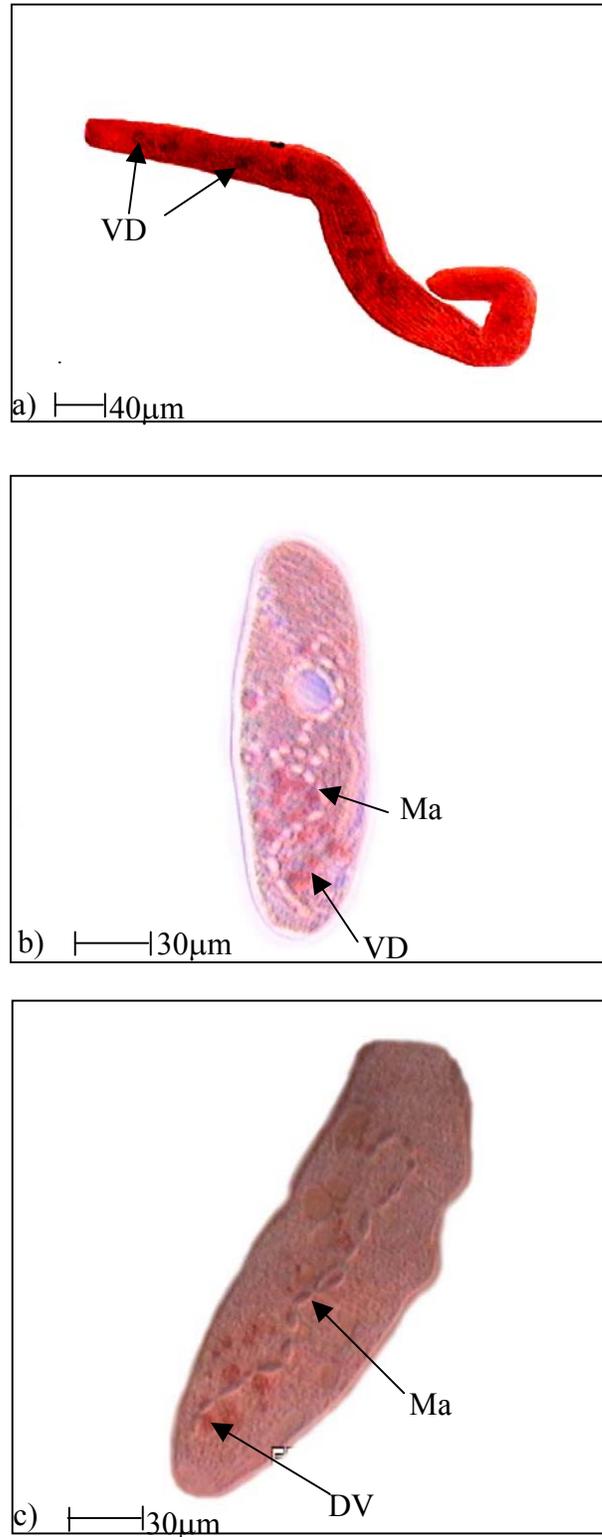


Fig. 10 Microfotografía de *S. intermedium* Vacuolas digestivas y macronúcleo
a) Campo claro 10X. b) y c) Tinción rojo neutro 10X. VD= Vacuola digestiva.
Ma=Macronúcleo.

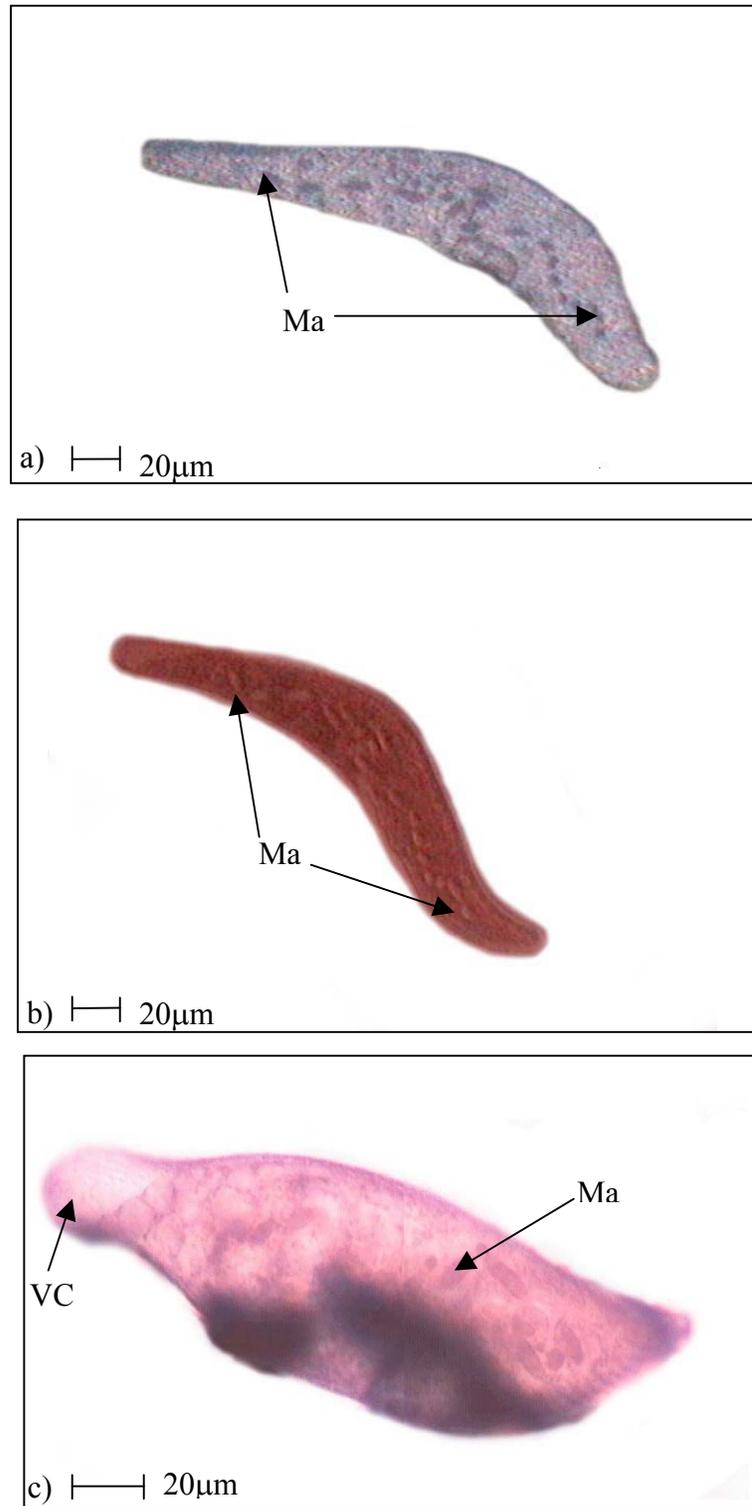


Fig. 11 Microfotografía de *S. intermedium*. a) Elementos de macronúcleo Contraste de fases 10X. b) Campo claro 10X. c) Tinción NMF 40X. VC=vacuola contractil



Fig. 12 Microfotografías de estructuras encontradas en los cultivos de *S. intermedium*, las cuales pueden ser quistes de alimentación (100X).

7.3 Tiempo de duplicación de *S. intermedium*

Una vez logrados los cultivos, se tomaron dos organismos con la finalidad de establecer el tiempo de duplicación mediante cuenta directa. A las 20 horas de cultivo se contó el mismo número, se realizó nuevamente la cuenta en intervalos de 20 horas, sucesivamente hasta las 140 horas. En la Fig.13 se muestran los resultados obtenidos en escala aritmética, pudiéndose apreciar el crecimiento exponencial de la población después de 140 horas de observación. A partir de los datos obtenidos se pudo establecer que el tiempo de duplicación es de 23 horas. Este dato es útil como referencia para establecer el tiempo

máximo de prueba para los ensayos de toxicidad, ya que no interferirá con la cuenta de organismos muertos o sobrevivientes.

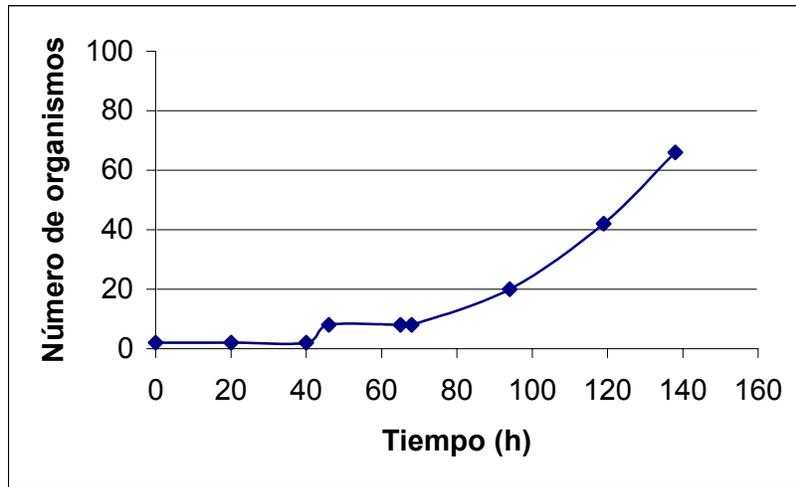


Fig. 13 Curva de crecimiento de *Spirostomum intermedium* cultivado en el laboratorio

Además empleando un equipo de videograbación integrado a un microscopio óptico marca Iroscope equipado con cámara e impresora digital marca Color Printer, fue posible observar y grabar el proceso de fisión transversal Fig. 14.

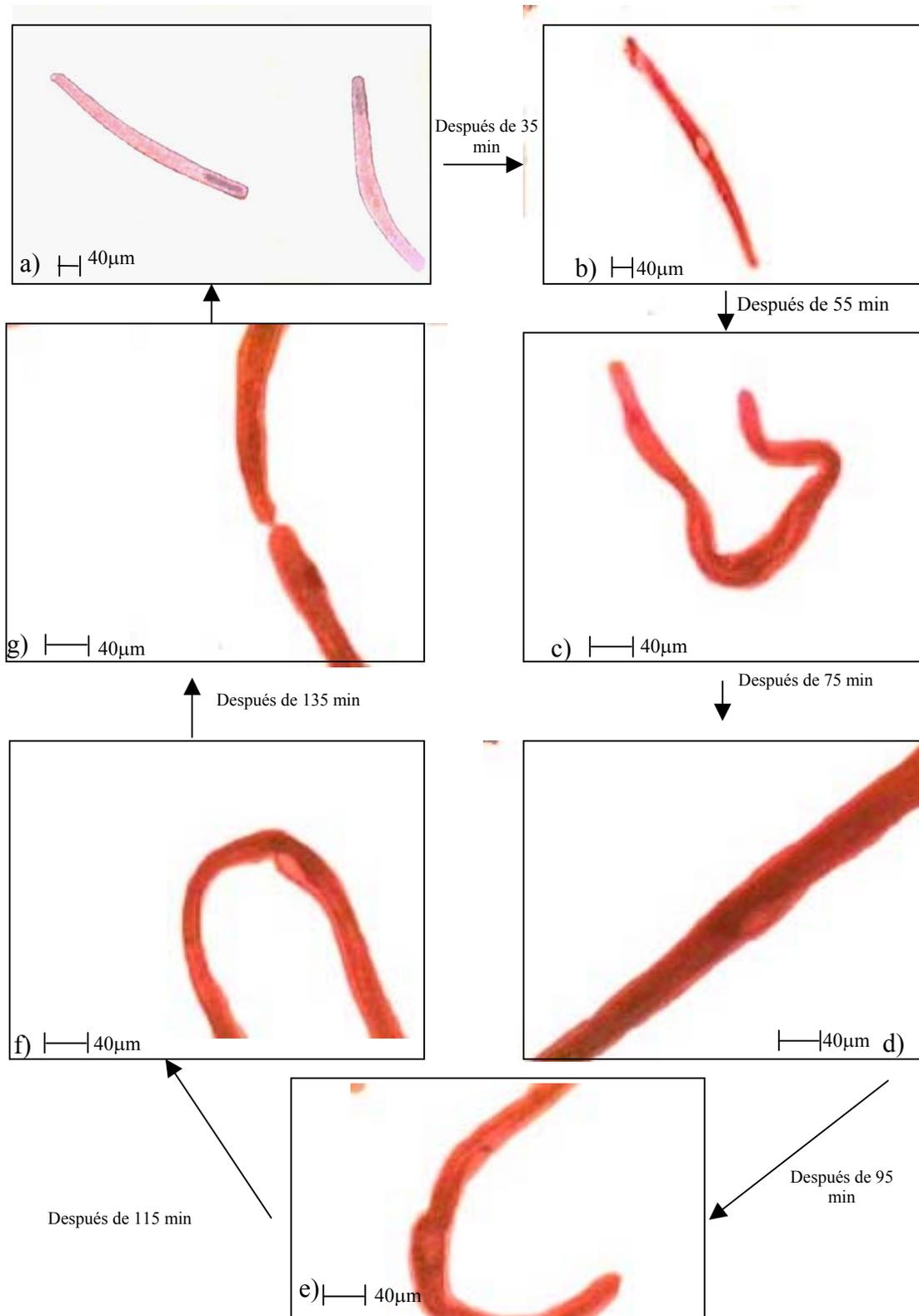


Fig. 14 Fisión transversal de *S. intermedium*. a y b) *S. intermedium* campo claro (lupa).c-g) campo claro 10 X.

7.4 Clasificación taxonómica de *P. caudatum* de acuerdo a Lynn y Small 2000

De acuerdo a la literatura y a tinciones vitales y permanentes realizadas, se determinó que el organismo cultivado fue *P. caudatum*.

Reino: Protozoa Goldfuss

Phylum: Ciliohora Doflein

Clase: Oligohymenophorea de Puyotorac

Subclase: Peniculia Fauré-Fremiet

Orden: Peniculida Fauré-Fremiet

Suborden: Peniculina Fauré-Fremiet

Familia: Parameciidae Dujardin

Género: *Paramecium* Hill

Especie: *Paramecium caudatum* Ehrenberg

7.5 Caracterización de *P. caudatum*

Protozoo ciliado libre nadador, fácil de encontrar en la naturaleza, tamaño relativamente grande, lo cual facilita su observación, está ampliamente distribuido en agua dulce estancada con materia orgánica en descomposición (Wagtendok, 1974).

La locomoción de *Paramecium* depende de los movimientos de los cilios, los cuales están controlados por comportamiento eléctrico de la membrana celular. El movimiento ciliar de reversa, está correlacionado con la despolarización de la membrana inducido por la activación de canales de calcio, el tiempo que se mantiene este movimiento, es proporcional a la duración de la acción potenciales es decir, a la corriente de calcio transmembranal, mientras que el movimiento normal de avance, está correlacionado con la hiperpolarización, por lo que cuando la célula se hiperpolariza, causa un incremento en la velocidad, y disminuye la frecuencia de los giros. Cuando algún factor provoca la repulsión de la célula de *Paramecium*, la célula se despolariza, incrementa la frecuencia de movimiento de reversa, e incrementa el número de giros. (Gonda *et al.*, 2004; Husser *et al.*, 2004; Takiguchi *et al.*, 2002; Ramoino *et al.*, 2003).

P. caudatum es de forma alargada, similar a la huella de una suela, cuya longitud es de 180-280 μm (Fig. 15 y 16).

La parte ventral del organismo es aplanada, con una depresión oral (Fig. 16,17-20, 22), la cuál empieza en la parte anterior y se prolonga hasta la mitad del cuerpo. El citostoma está situado en la parte posterior de dicha depresión. Abajo del citostoma hay vacuolas digestivas (Fig. 16,18,19,20 y 22), delimitadas por sistemas fibrilares, formando un circuito en el citoplasma (ciclosis), que concluye en el citoprocto, ubicado en la parte ventral posterior del cuerpo, donde los desechos de la digestión son excretados (Wagtendok, 1974). Presenta ciliatura somática uniforme, formada por 116 a 120 cinetias (Fig. 17 y 21) contadas a partir del lado derecho del citostoma, tiene alrededor de 10,000-14,000 cilios en la superficie de la célula. Posee un micronúcleo compacto, generalmente situado en la concavidad del macronúcleo (Fig. 23), el cual está ubicado en la parte central y es ovoide, éste controla la mayoría de las actividades celulares (casi todos los eventos citoplásmicos y nucleares), incluyendo la inmadurez sexual después de la conjugación (Kimura y Mikami, 2003).

Posee dos vacuolas contráctiles (Fig. 18 y 19) las cuales son orgánulos osmoreguladores, que expulsan el exceso de agua citosólica adquirida osmóticamente y así la osmolaridad es constante. Están situadas cada una en la parte anterior y posterior, rodeadas por 5-10 ampulas y conductos radiales. Las vacuolas alternan movimientos de contracción (sístole) y dilatación (diástole), estando las vacuolas conectadas, mediante sistemas colectores de canales (Tani *et al.*, 2002).

Se reproduce por fisión binaria y en intervalos se someten a dos tipos de reorganización nuclear que son la conjugación y la autogamia este último un proceso sexual de una sola célula que involucra meiosis y autofertilización (Kato *et al.*, 2005).

Se alimenta de bacterias, materia orgánica en descomposición, pequeños protozoos, algas y levaduras (Silva, 2003). Como medio de defensa posee gran cantidad de tricocistos (Fig 22-24), que son estructuras rodeadas de membrana, y son estructuras de expulsión llamadas extrusomas que reaccionan ante algún estímulo.

Paramecium ha sido empleado como organismo de prueba para monitorear la contaminación del agua (Takiguchi *et al.*, 2002).

En el caso de *Paramecium*, las muestras fueron recolectadas de la planta de tratamiento biológico de lodos activados de Ciudad Universitaria. Al igual que *Spirostomum intermedium* se traslado mediante micropipeteo a frascos, una vez inoculada la infusión de

lechuga con el organismo se mantuvieron en una incubadora a 28 °C , con un fotoperíodo de 9 horas de luz por 15 de oscuridad. De esta manera, se logro aislar al ciliado *Paramecium* e identificar el organismo, con el cual se llevaron a cabo los experimentos programados para la segunda etapa experimental. La manipulación de los ciliados se hizo con ayuda de un microscopio estereoscópico (marca Iroscope modelo N3-14 con aumentos de 0.7 a 4.5 X, con una lente accesoria de 2X), realizándose observaciones en vivo y con diferentes tinciones tanto vitales como permanentes.

También se realizaron mediciones de los organismos en vivo, determinándose que miden 211 μm de longitud y 66 μm de anchura.

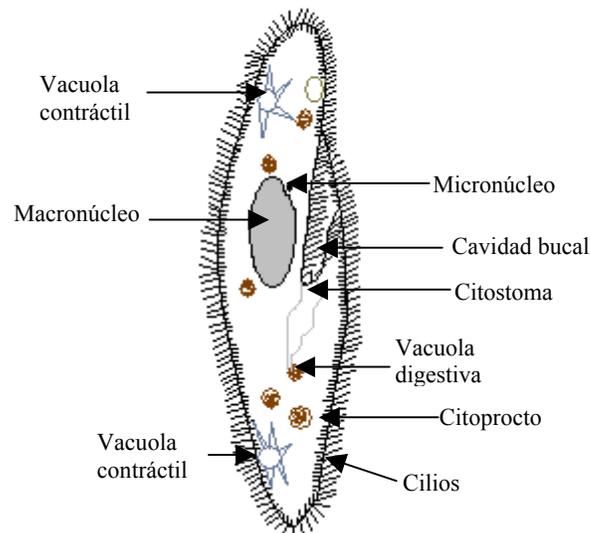


Fig. 15 Esquema general de *Paramecium caudatum*

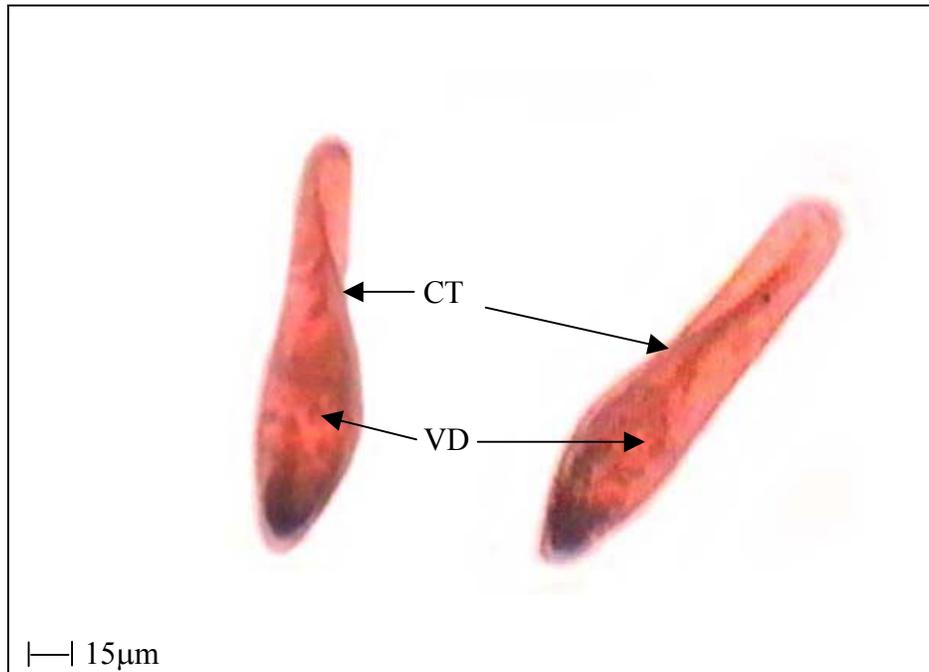


Fig. 16 Microfotografía de *P. caudatum*. Campo claro 10X. Citostoma (CT) y vacuolas digestivas (VD) en vivo.

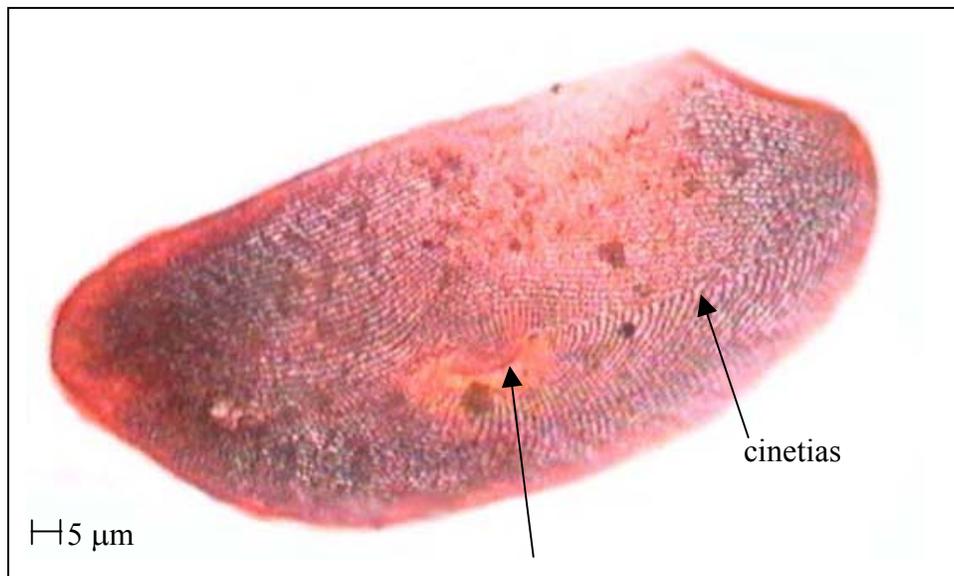


Fig. 17 Microfotografía de *P. caudatum* la flecha señala el citostoma. Tinción de Klein 100X. También se aprecian las numerosas cinetias que posee el organismo.

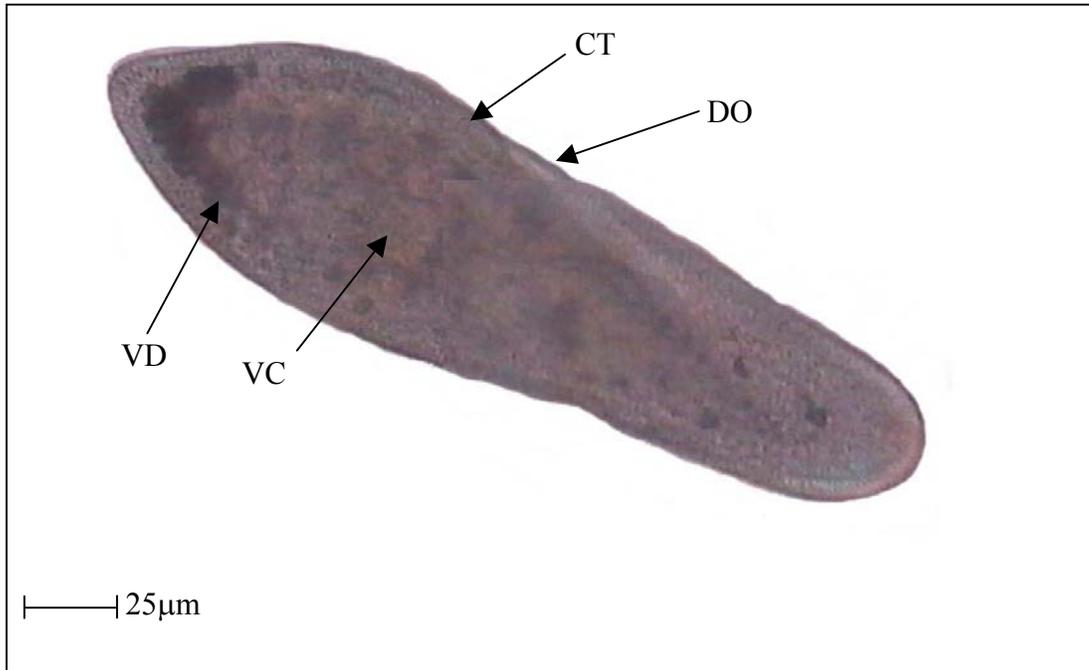


Fig.18 Microfotografía *P. caudatum*. Campo claro 40X. Vacuola contráctil (VC). Vacuola digestiva (VD). Cytostoma (CT) y depresión oral (DO).

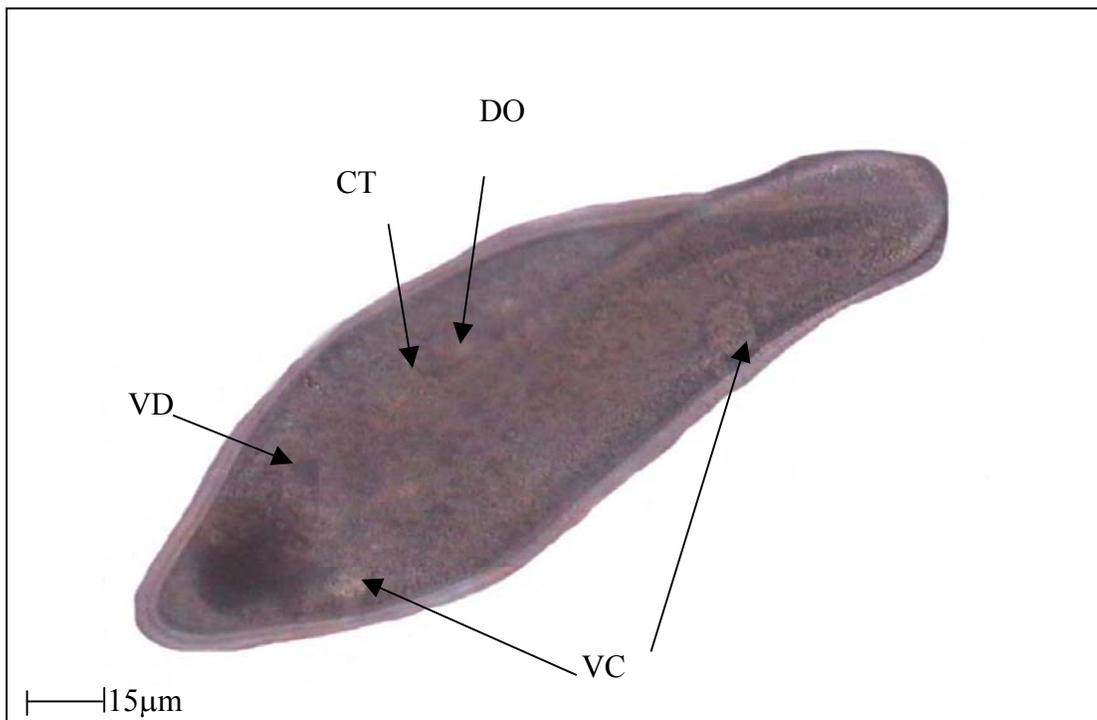


Fig.19 Microfotografía de *P. caudatum* Campo claro 40X. Se observan las 2 vacuolas contráctiles (VC). Cytostoma (CT). Vacuolas digestivas (VD) y depresión oral. (DO).

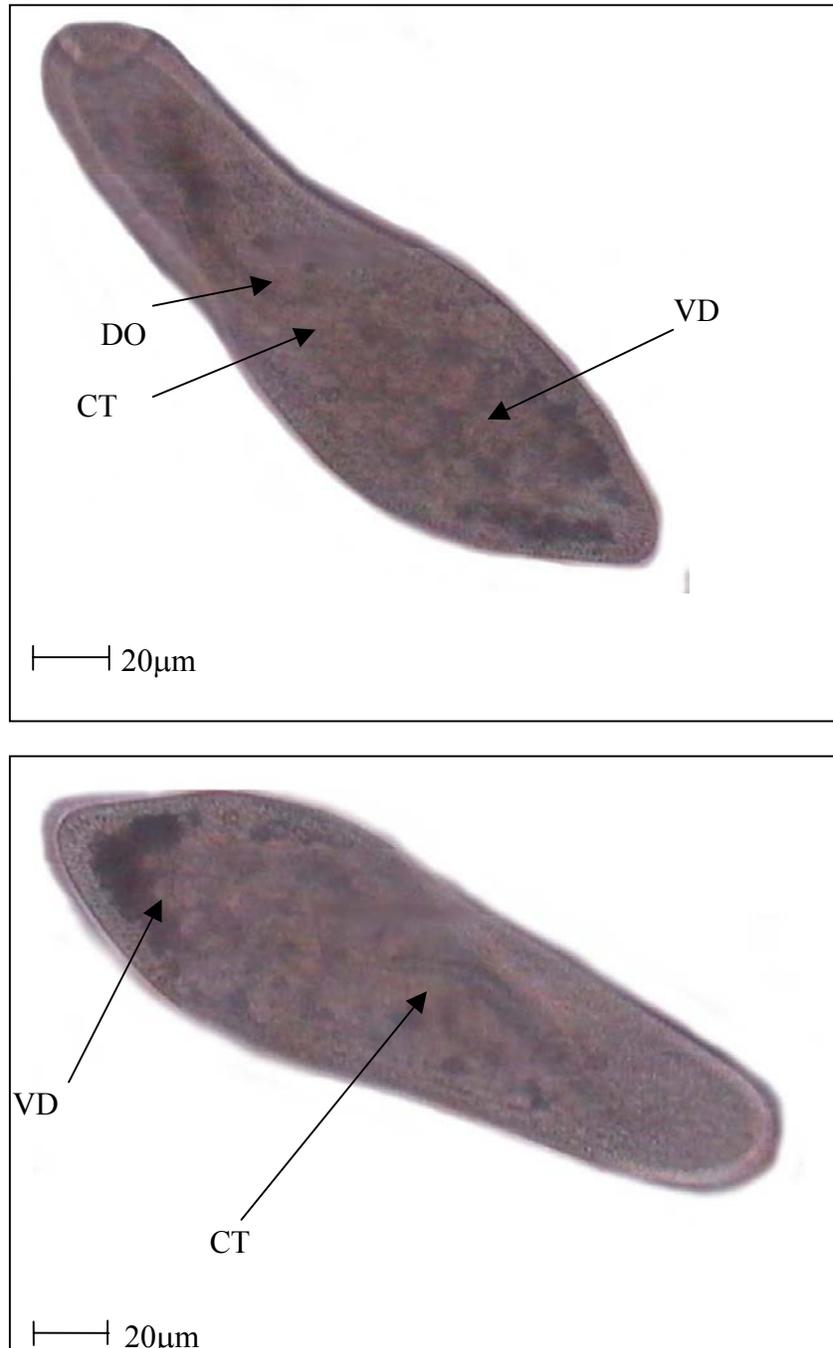


Fig.20 Microfotografía de *P. caudatum*. Campo claro (40X). Vacuolas digestivas (VD). Cistostoma (CT) y depresión oral (DO).



Fig. 21 Microfotografía de *P. caudatum*. La flecha señala las cinetias. Tinción de Klein 100X.

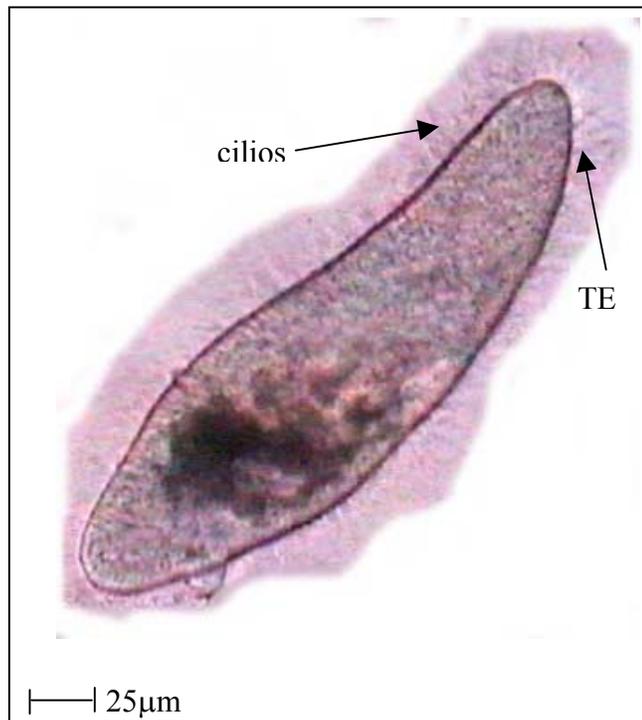
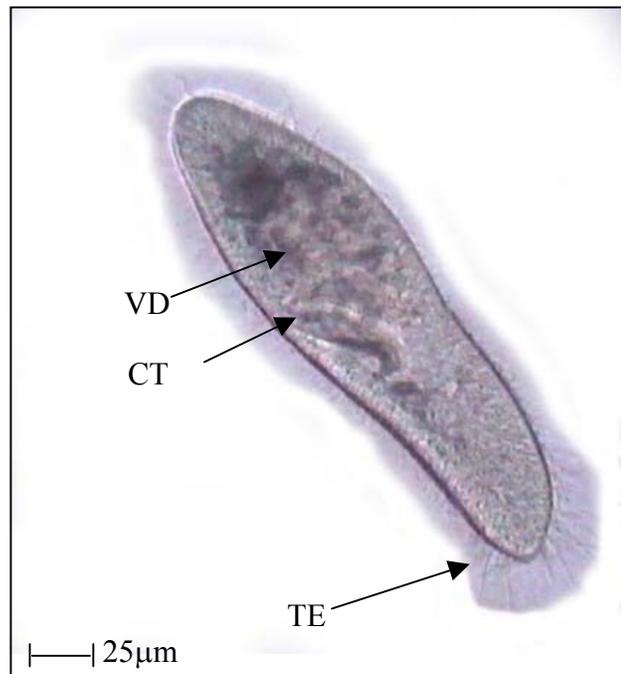


Fig. 22 Microfotografía de *P. caudatum* en las cuales se aprecian los tricocistos expulsados (TE). Citostoma (CT). Vacuolas digestivas (VD). Tinción hematoxilina 40 X.

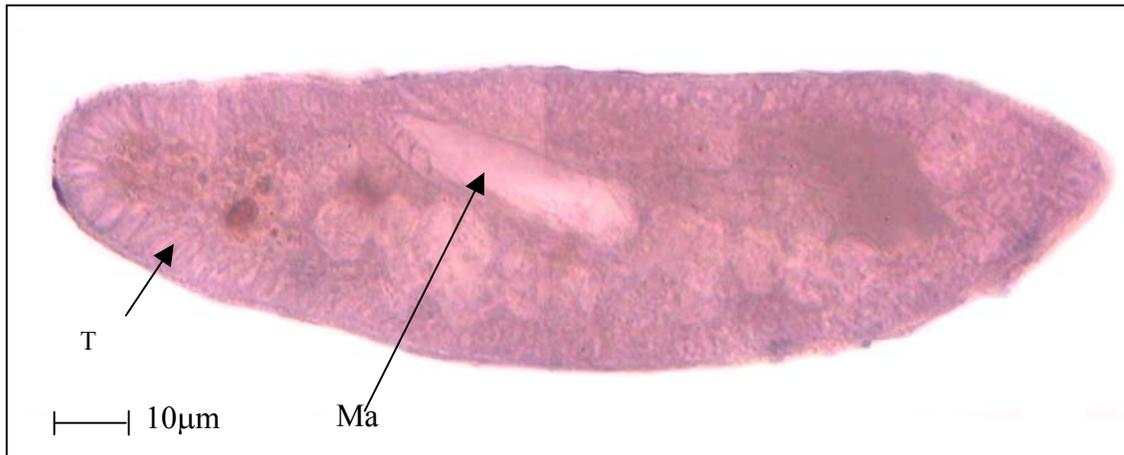


Fig. 23 Microfotografía de *P. caudatum*, se observa el macrónucleo (Ma) y tricocistos (T) Tinción hematoxilina 40X.



Fig. 24 Microfotografía de *P. caudatum*. Tricocistos expulsados (TE). Tinción modificación de protargol (Silva-Neto 2000)100X.

7.6 Tiempo de duplicación de *P. caudatum*

Una vez logrados los cultivos, se tomaron dos organismos con la finalidad de establecer el tiempo de duplicación mediante cuenta directa. A las 20 horas de cultivo se contó el mismo número, se realizó nuevamente la cuenta en intervalos de 20 horas, sucesivamente hasta las 60 horas.

En la Fig. 25 se muestran los resultados obtenidos en escala aritmética, pudiéndose apreciar el crecimiento exponencial de la población después de 60 horas de observación. A partir de los datos obtenidos se pudo establecer que el tiempo de duplicación es de 20 horas. Este dato es útil como referencia para establecer el tiempo máximo de prueba para los ensayos de toxicidad, ya que no interferirá con la cuenta de organismos muertos o sobrevivientes.

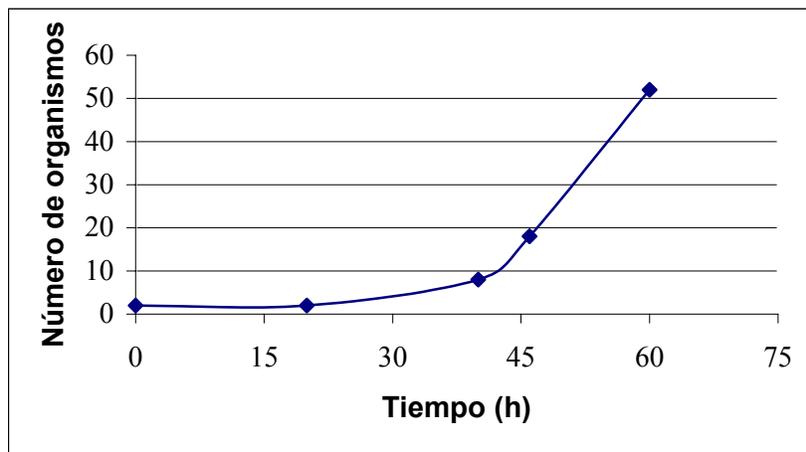


Fig. 25 Curva de crecimiento de *P. caudatum* cultivado en el laboratorio

8. ETAPA EXPERIMENTAL 2

Siguiendo la estrategia de trabajo presentada, la segunda etapa se realizó a partir de la identificación de las especies cultivadas en el laboratorio. Esta etapa se enfocó a determinar el nivel de toxicidad provocado por la exposición de Cu, Cd, Zn y Ag en forma de nitratos por separado en las dos poblaciones controladas de *S. intermedium* y *P. caudatum*.

8.1 Metodología Experimental

8.1.1 Elaboración de las soluciones de prueba

Todos los metales empleados, fueron utilizados, en forma de nitratos, utilizando agua desionizada para preparar las soluciones.

A partir del peso molecular de la fórmula, se determinó el porcentaje del metal a emplear y posteriormente, se preparó la solución a la concentración deseada.

Los reactivos utilizados se colocaron dentro de un desecador para extraer la humedad que pudiera contener, con la finalidad de tener menor error al pesar, en todo momento se utilizó material volumétrico para la preparación de las soluciones

Se tomó de referencia los valores máximos permisibles que establece la NOM-001 para elaborar las soluciones por diluciones sucesivas del 50 %, o hasta la concentración a la cual sobrevivían todos los organismos de prueba.

Dichos valores máximos son: Cu:6 mg/L, Cd:0.4 mg/L, Zn: 20 mg/L y en el caso de Ag, no se establece el valor, por lo que se decidió partir de 10 mg/L ya que no se tenían referencias específicas, a partir de que concentración resulta tóxico para los protozoos.

8.1.2 Pruebas de toxicidad

Una vez determinadas las concentraciones de las cuales se partiría, se desarrollaron las pruebas de toxicidad, empleando a individuos de *S. intermedium* y de *P. caudatum*, por separado. Para cada solución de metales se colocaron en cajas de petri, 10 organismos obtenidos mediante técnica de micropipeteo, manejándose tres cajas de prueba, con su respectivo testigo cada una, manipulándose un total de 60 organismos por cada

concentración empleada. Se añadió 100 µL de la solución de prueba, y para los testigos se añadieron 100 µL de agua desionizada, observando cada 5 minutos bajo el microscopio estereoscópico hasta un período de 2 horas. Posteriormente se calculó el valor de CL₅₀ mediante Probit, cuya metodología se encuentra descrita en la Norma mexicana NMX-AA-087-1995-SCFI y en Castillo (2004). (Fig.26).

Características utilizadas en cada concentración:

Recipientes de prueba (Número de repeticiones)	3
Recipientes testigo experimental	3
Número de organismos expuestos por recipiente	10
Total de organismos empleados por cada concentración	60
Cantidad de solución adicionada	100 µL
Tiempo de observación, cada 5 minutos hasta	2 horas

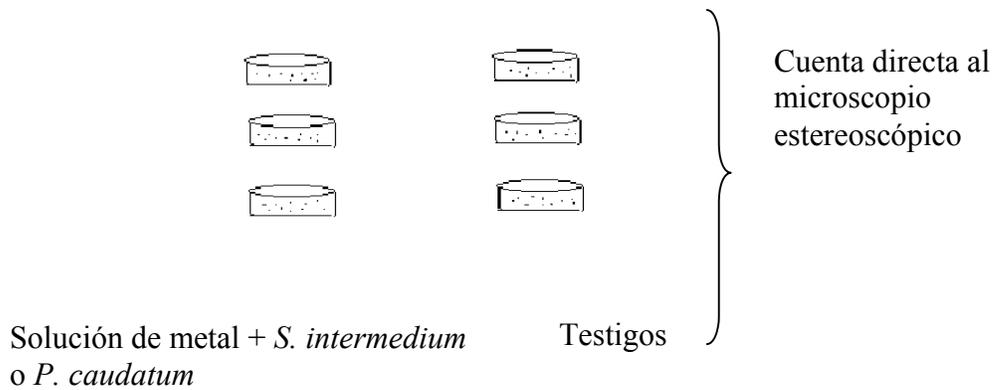


Fig. 26 Ejemplo de la disposición de las cajas conteniendo a *S. intermedium* o *P. caudatum* al ser expuestos a las diferentes concentraciones de cada metal evaluado.

9 RESULTADOS ETAPA EXPERIMENTAL 2

9.1 Resultados de la evaluación del efecto de Cu, Cd, Zn y Ag en *S. intermedium*

9.1.1 Respuesta de *S. intermedium* a la presencia de Cu

Las concentraciones de Cu empleadas fueron de 0.0117–6 mg/L, la primera concentración fue la mínima utilizada y a la que sobrevivieron de manera satisfactoria los organismos. Al exponer a *S. intermedium* a las concentraciones de 6 mg/L, 3 mg/L, 1.5 mg/L, 0.187 mg/L, 0.093 mg/L y 0.046 mg/L de Cu, se observó que los 10 individuos murieron antes de los 20 minutos, sin embargo, a la concentración de 0.0468 mg/L un organismo logró sobrevivir durante 80 min y posteriormente murió, esto se puede apreciar en la Fig. 27, la cual muestra el tiempo y la concentración a la que se expusieron los organismos sin que logaran sobrevivir el tiempo de la prueba.

En la Fig. 28 se observan efectos relacionados a la exposición como: deformaciones morfológicas; hinchamiento, presentaban reducción en el tamaño, pérdida de motilidad, reflejándose en la disminución de la velocidad del nado, alteración la vacuola contráctil y finalmente se presentaba lisis celular, éstos cambios morfológicos se observan.

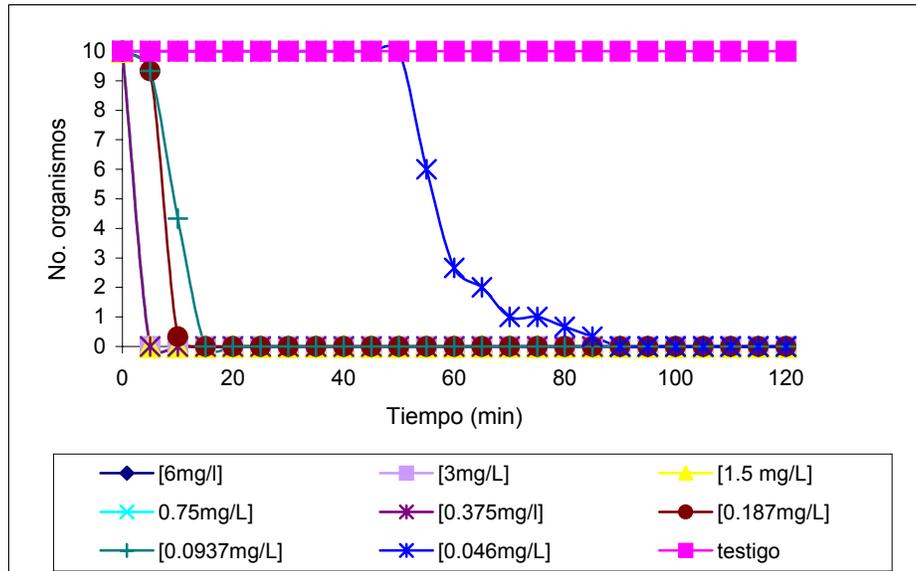


Fig. 27 Exposición de *S. intermedium* a [Cu].

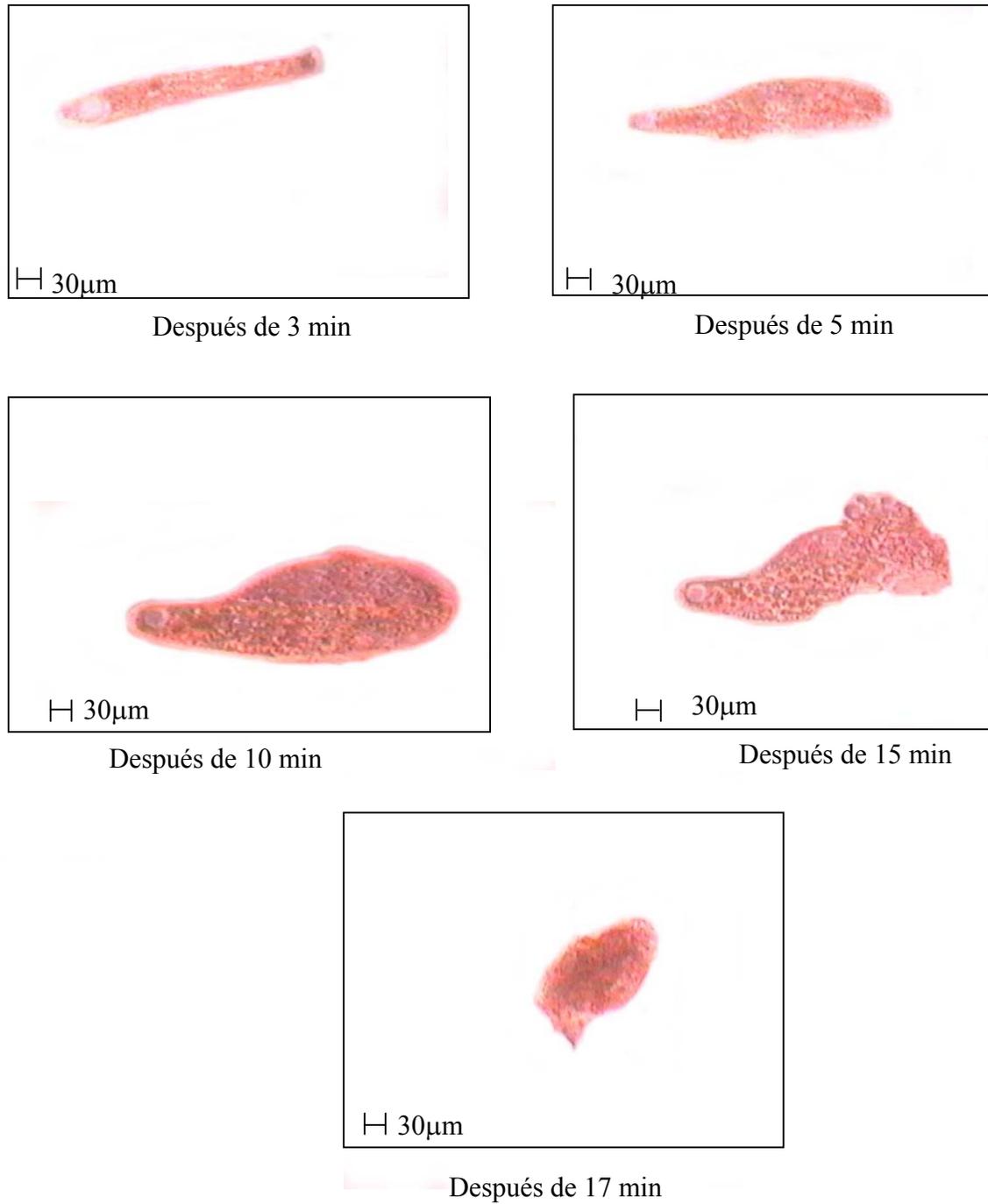


Fig. 28 Cambios morfológicos de *S. intermedium* con [0.0937 mg/L] de Cu

Se encontró que a la concentración de 0.0175 mg/L lograron sobrevivir 4 organismos durante las 2 horas de exposición, lo cual se puede observar en la Fig. 29.

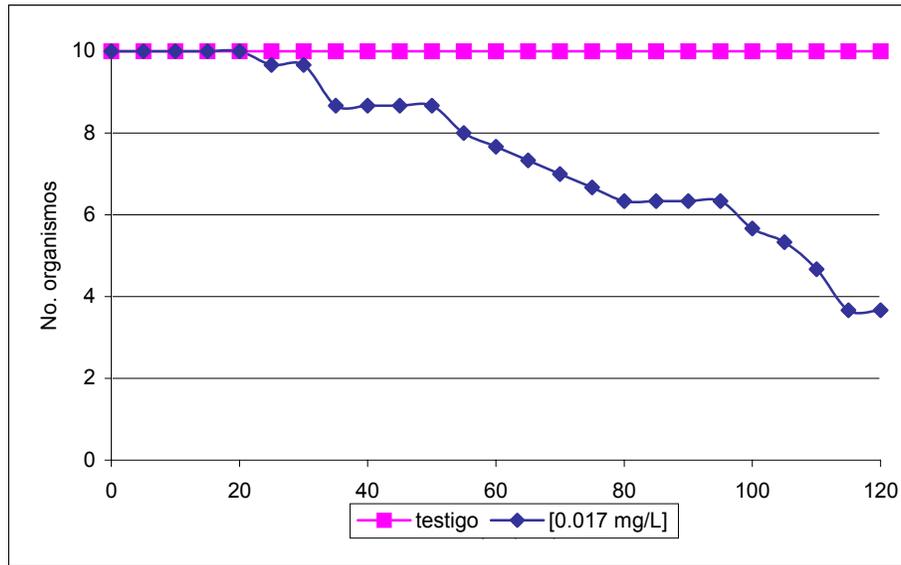


Fig. 29 Exposición de *S. intermedium* a [0.0175 mg/L] de Cu

En la Fig. 30 se observa que a la concentración de 0.011 mg/L de Cu, se apreció que los diez organismos, lograron sobrevivir de manera satisfactoria, ante la exposición durante las 2 horas.

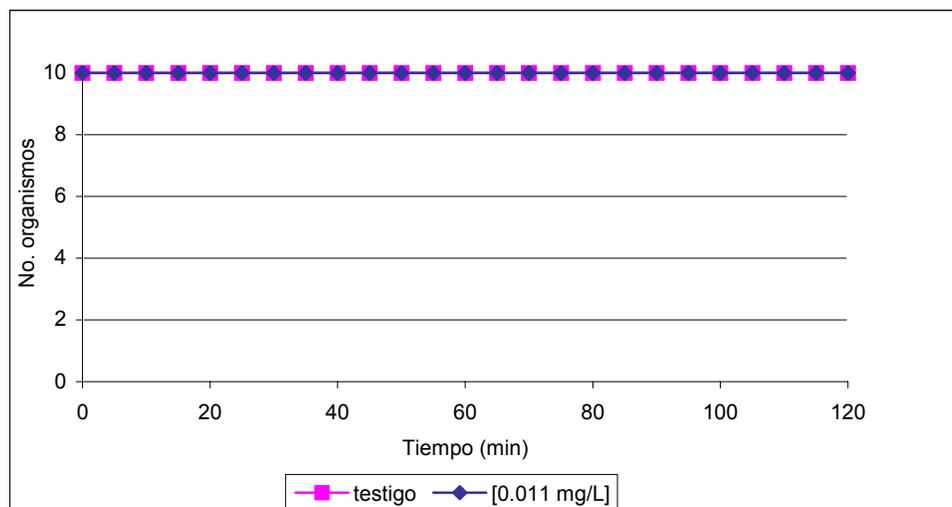


Fig. 30 Exposición de *S. intermedium* a [0.011 mg/L] de Cu

Los resultados obtenidos indican que el Cu, en forma de nitrato, es un compuesto altamente tóxico para *S. intermedium* presentando una CL_{50} a una concentración de 0.01707 ± 0.00047 que es la concentración a la que se muere la mitad de los organismos expuestos

durante 2 horas de experimento. Esto se puede observar en la Fig.31 donde se grafican concentraciones empleadas y el valor de CL_{50} calculado (representado por un cuadro) el cual fue calculado por el método Probit.

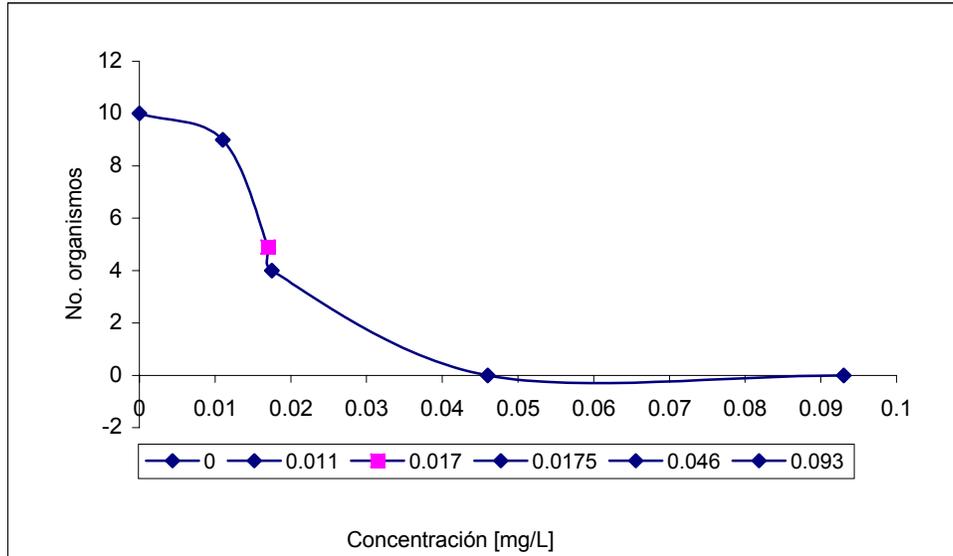


Fig. 31 CL_{50} obtenida para Cu en *S. intermedium* mediante el método Probit.

9.1.2 Respuesta de *S. intermedium* a la presencia de Cd

Las concentraciones de Cd empleadas fueron de 0.0125 mg/L a 0.4 mg/L el primer valor fue la concentración mínima utilizada y a la que sobrevivieron los 10 organismos expuestos, es decir que a ésta corresponde el valor del efecto no observable. Al exponer a *S. intermedium* a la concentración de 0.4 mg/L, se observó que los 10 individuos murieron antes del término de la prueba, donde solamente un organismo logró sobrevivir hasta el minuto 75 (Fig. 32).

En la Fig. 33 se observa que en las concentraciones de 0.2 mg/L y 0.1 mg/L un solo organismo logró sobrevivir durante los 120 minutos.

A la concentración de 0.05mg/L de Cd, dos organismos lograron sobrevivir durante las 2 horas de exposición (Fig 34).

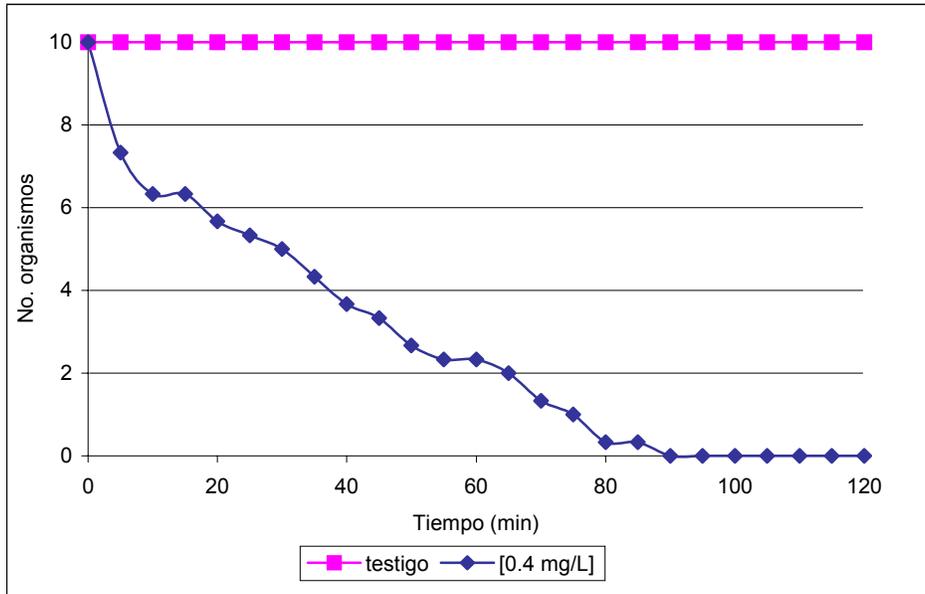


Fig. 32 Exposición de *S. intermedium* a [0.4mg/L] de Cd.

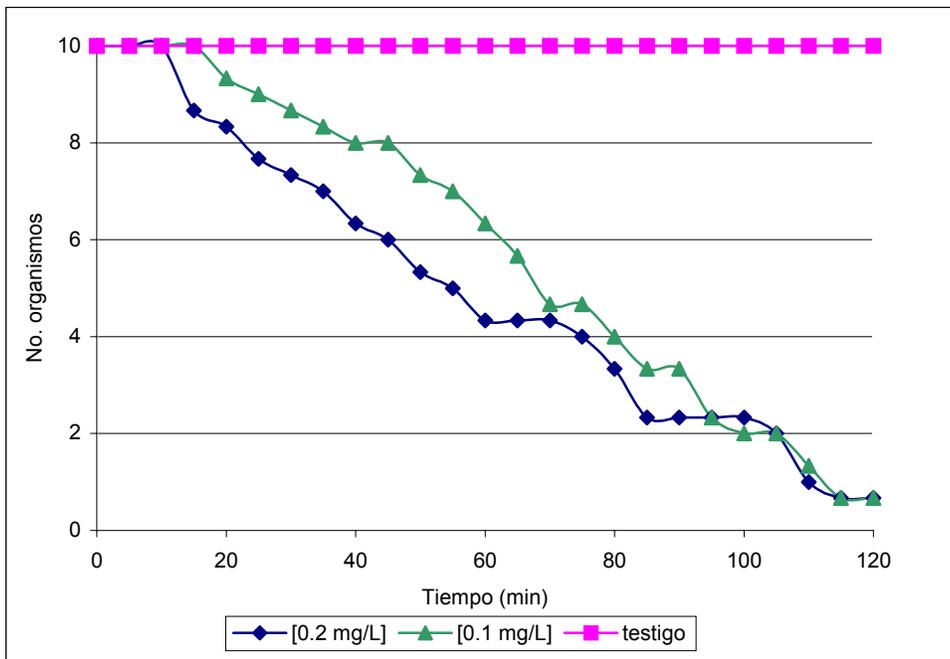


Fig. 33 Exposición de *S. intermedium* a [0.2 mg/L y 0.1mg/L] de Cd.

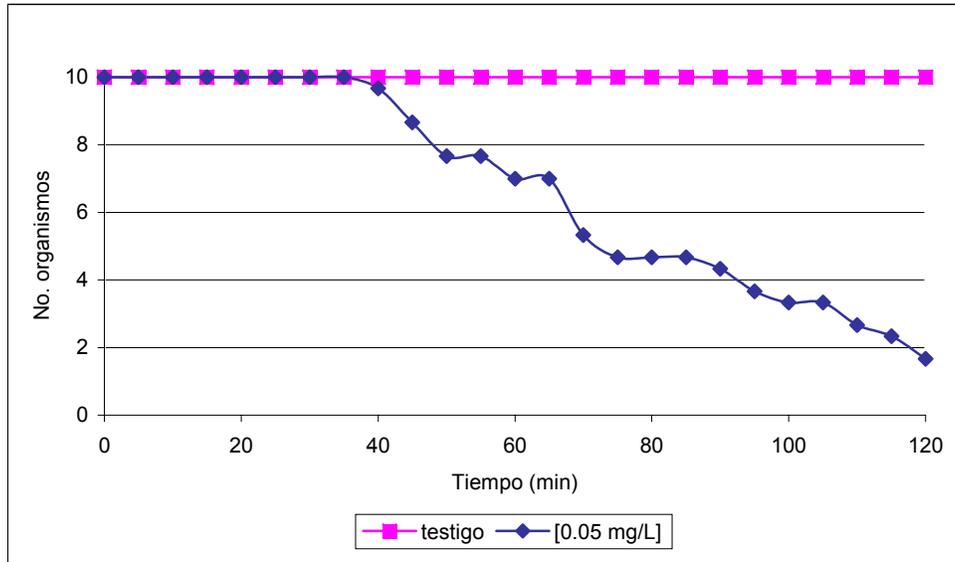


Fig. 34 Exposición de *S. intermedium* a [0.05 mg/L] de Cd.

A la concentración de 0.025mg/L de Cd un total de 8 organismos logró sobrevivir durante las 2 horas (Fig. 35).

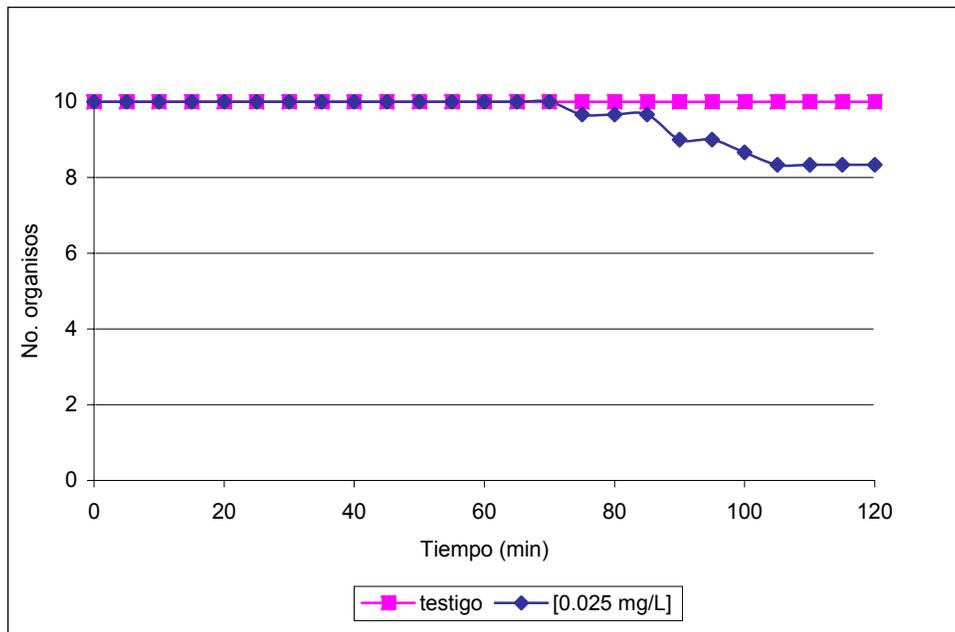


Fig. 35 Exposición de *S. intermedium* a [0.025 mg/L] de Cd.

Finalmente a la concentración de 0.0125 mg/L de Cd, todos los organismos lograron sobrevivir de manera satisfactoria, siendo este valor el correspondiente al efecto no observable (Fig. 36).

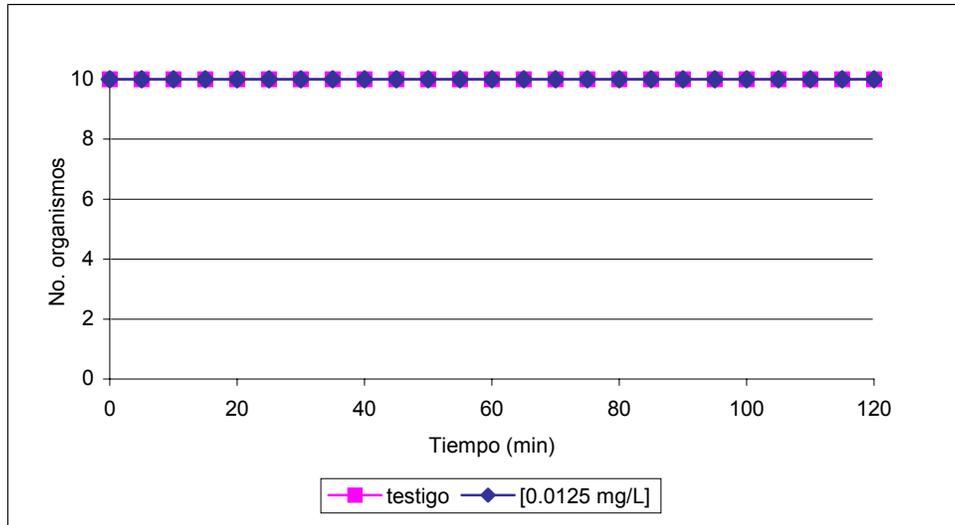


Fig. 36 Exposición de *S. intermedium* a [0.0125mg/L] de Cd

La concentración a la que se muere la mitad de la población es de 0.04014 ± 0.0024 mg/L (CL_{50}) calculado mediante el método Probit, en la Fig. 37 se representa el valor de CL_{50} calculado y concentraciones empleadas.

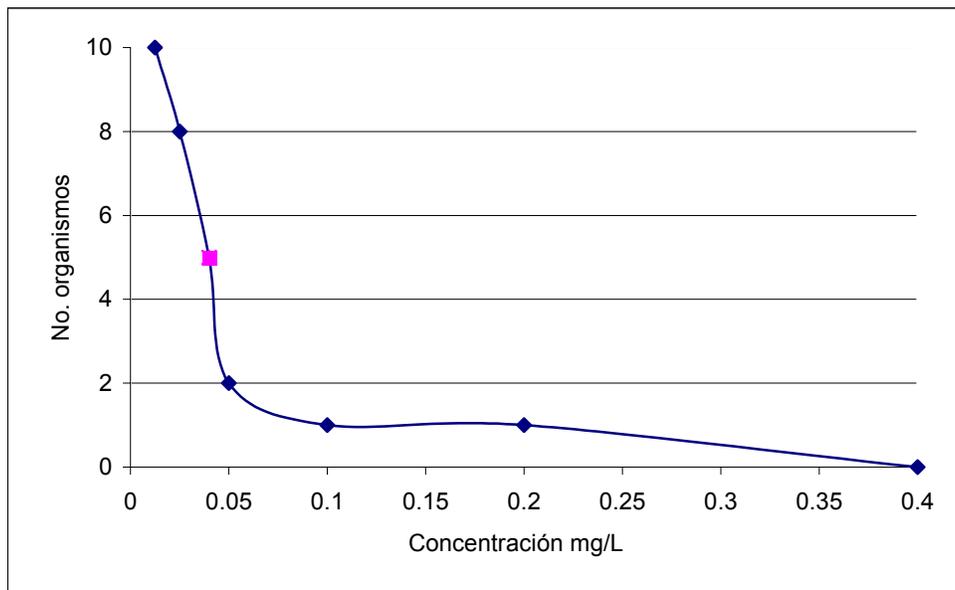


Fig. 37 CL_{50} de obtenida para Cd en *S. intermedium* mediante el método Probit

Los ciliados presentaban deformaciones morfológicas como: hinchamiento, contracciones constantes, disminución de tamaño y en la velocidad de nado, modificaciones en la vacuola contráctil y finalmente se presentaba la lisis celular (Fig. 38).

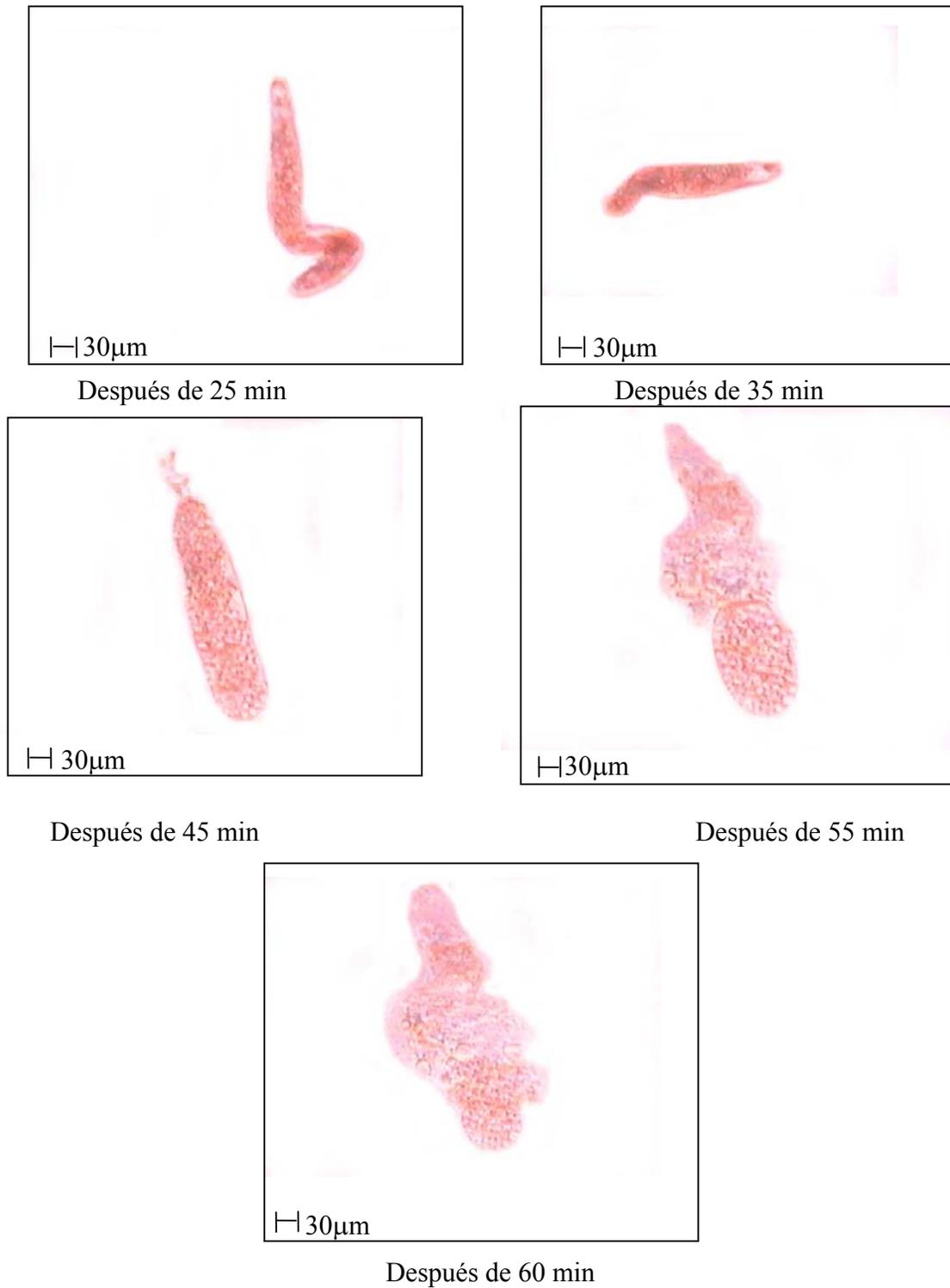


Fig. 38 Cambios morfológicos de *S. intermedium* con [0.4mg/L] de Cd

9.1.3 Respuesta de *S. intermedium* a la presencia de Zn

Las concentraciones de Zn empleadas fueron de 0.002312 mg/L hasta 20mg/L, el primer valor fue la concentración mínima utilizada y corresponde al efecto no observable, ya que sobreviven los 10 organismos expuestos.

Al exponer a *S. intermedium* a las concentraciones de 20 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, 2.5 mg/L, 1.25 mg/L, 0.625 mg/L, 0.3125 mg/L, 0.15625 mg/L, 0.0390 mg/L, 0.0195 mg/L, 0.0092 mg/L, 0.004625 mg/L los 10 individuos murieron antes de los 20 minutos de la prueba Fig.39

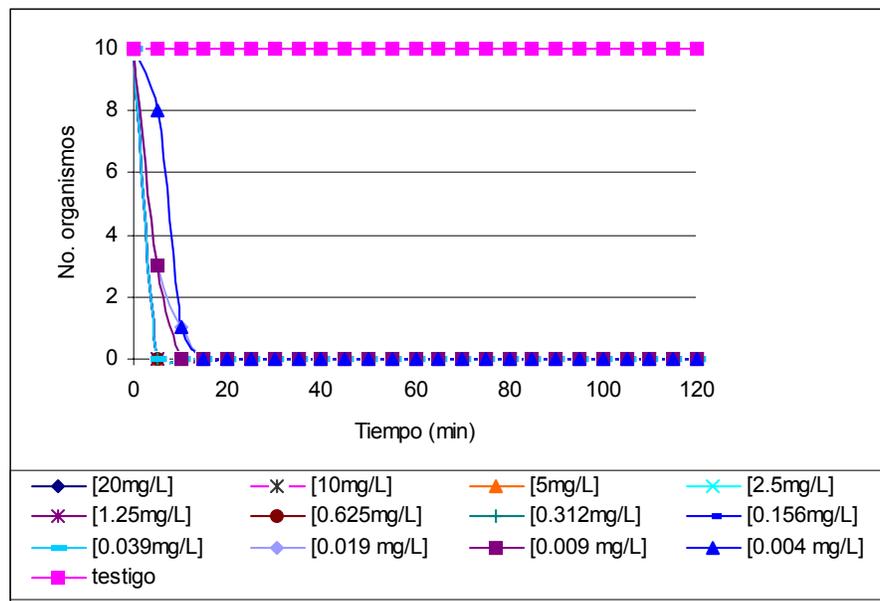


Fig. 39 Exposición de *S. intermedium* a [Zn]

Los ciliados presentaban deformaciones morfológicas como: hinchamiento, contracciones continuas, reducción de tamaño y disminución de la velocidad del nado y posteriormente la célula se lisaba (Fig. 40).

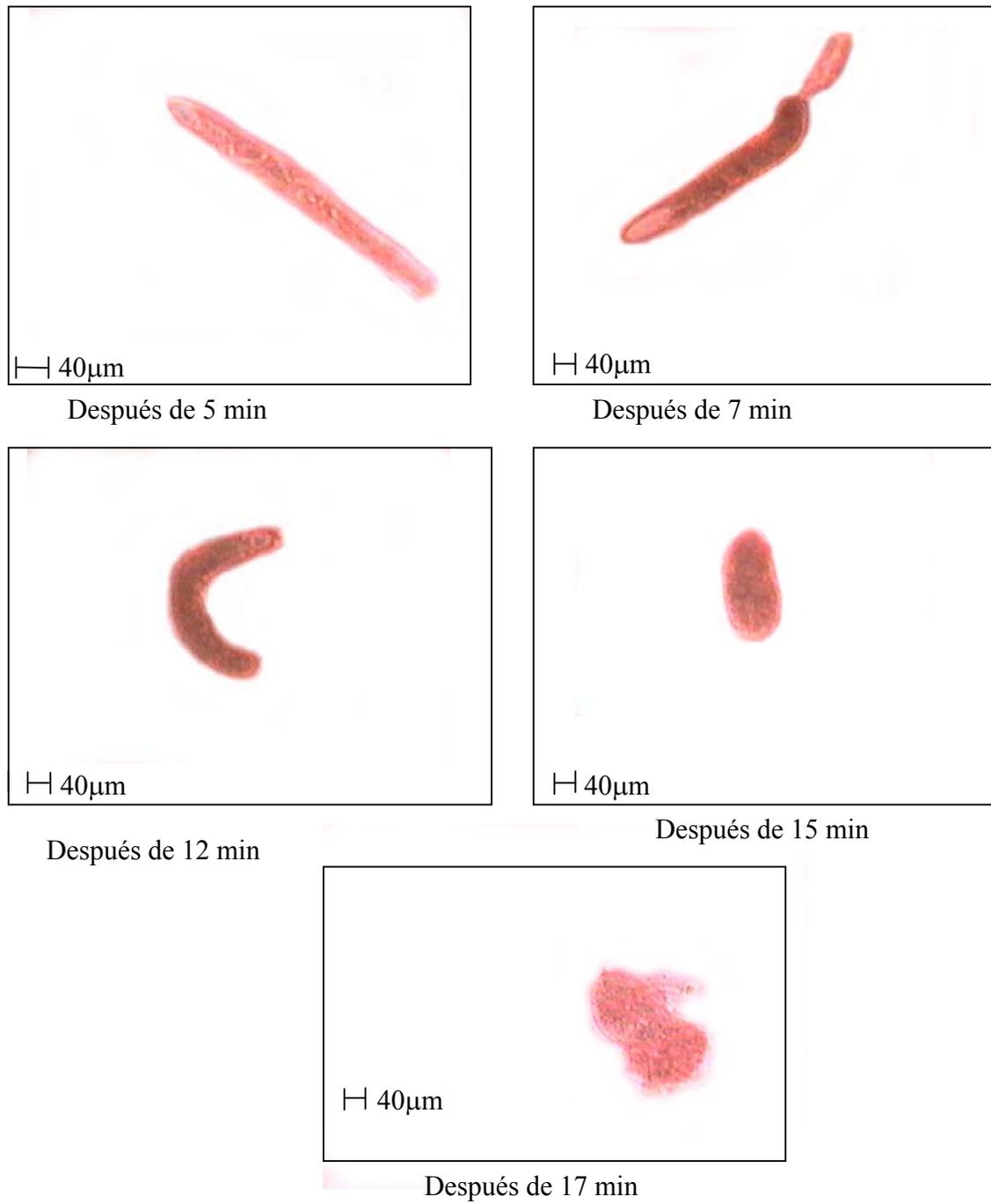


Fig.40 Cambios morfológicos de *S. intermedium* con [0.0046 mg/L] de Zn

En la Fig. 41 se observa que a la concentración de 0.0028 mg/L de Zn, lograron sobrevivir seis organismos durante las 2 horas de exposición.

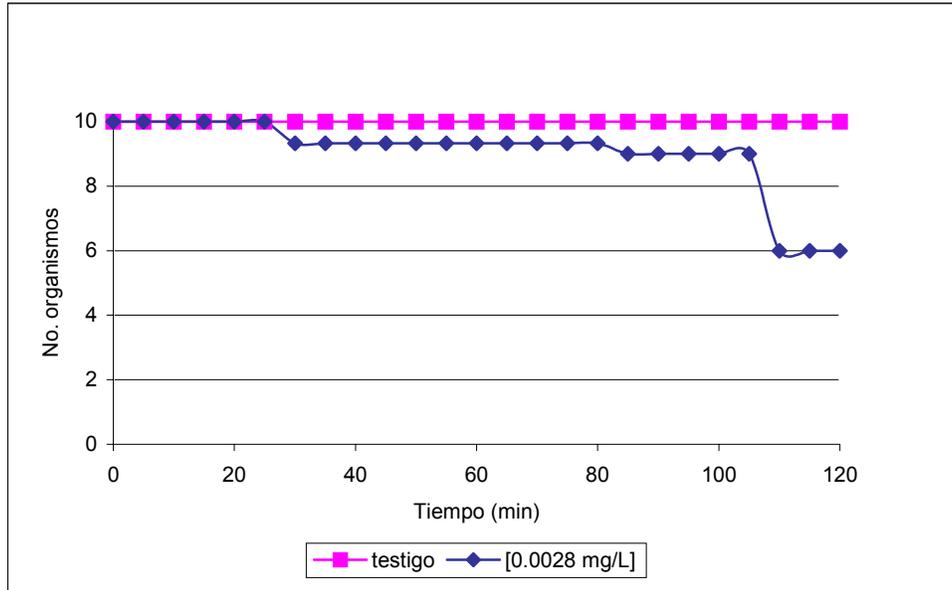


Fig. 41 Exposición de *S. intermedium* a [0.0028 mg/L] de Zn.

Finalmente, se aprecia en la Fig. 42 que a la concentración de 0.0023 mg/L lograron sobrevivir los 10 organismos de manera satisfactoria, durante las 2 horas de la prueba. siendo esta concentración el valor del efecto no observable.

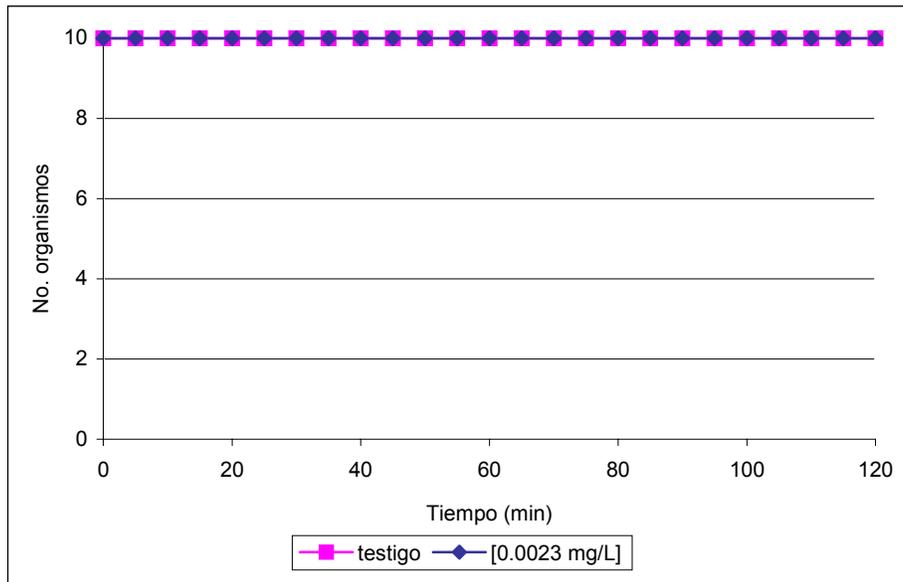


Fig. 42 Exposición de *S. intermedium* a [0.0023 mg/L] de Zn

La concentración a la que se muere la mitad de la población es de 0.003296 ± 0.00021316 mg/L (CL_{50}) calculado mediante el método Probit, en la Fig. 43 se aprecia dicho valor y el de concentraciones empleadas.

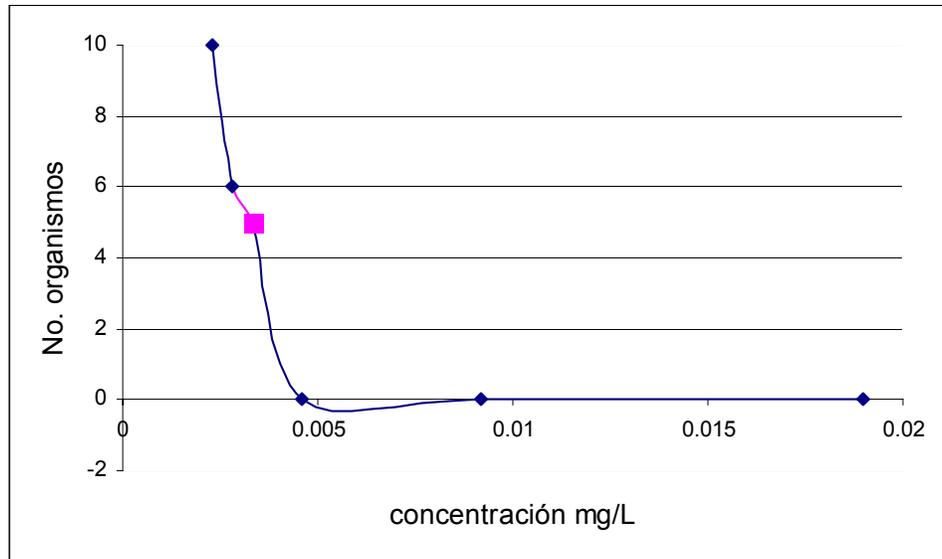


Fig. 43 CL_{50} obtenida para Zn en *S. intermedium* mediante el método Probit.

9.1.4 Respuesta de *S. intermedium* a la presencia de Ag

Las concentraciones de Ag empleadas fueron de 0.078 mg/L a 10mg/L el primer valor fue la concentración mínima utilizada y este corresponde al valor del efecto no observable, ya que sobrevivieron los 10 organismos expuestos.

Los ciliados presentaron deformaciones morfológicas tales como: reducción del tamaño celular, hinchaban, disminuían la velocidad del nado, alteraciones en la vacuola contráctil y finalmente lisis celular (Fig. 44).

Como se observa en la Fig.45, al exponer a *S. intermedium* a las concentraciones de 10 mg/L, 5 mg/L, 2.5 mg/L, 1.25 mg/L, 0.625 mg/L, 0.3125 mg/L y 0.1562 mg/L se observó que los 10 individuos murieron antes del término de la prueba.

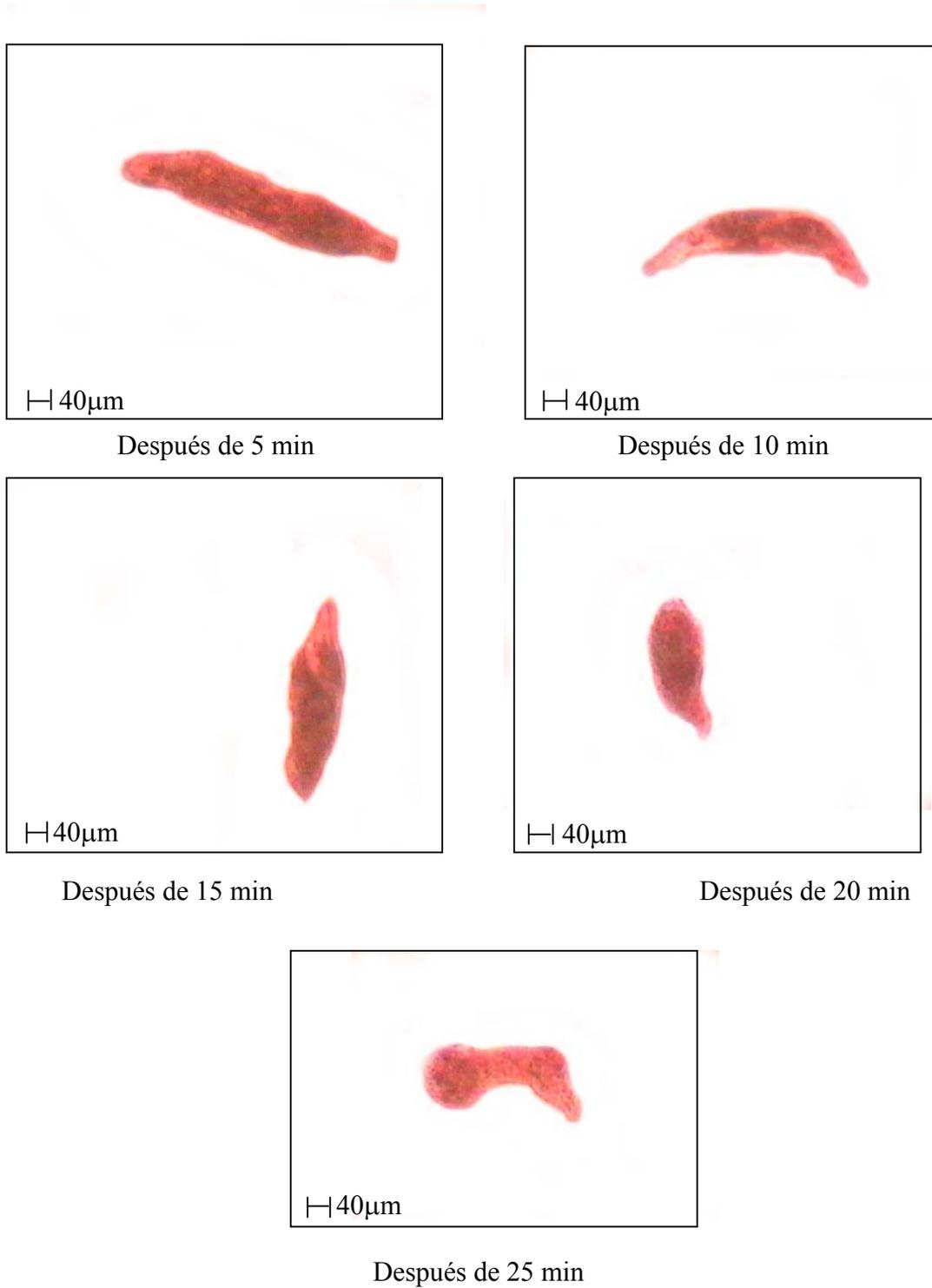


Fig. 44 Cambios morfológicos de *S. intermedium* con [0.312 mg/L] de Ag

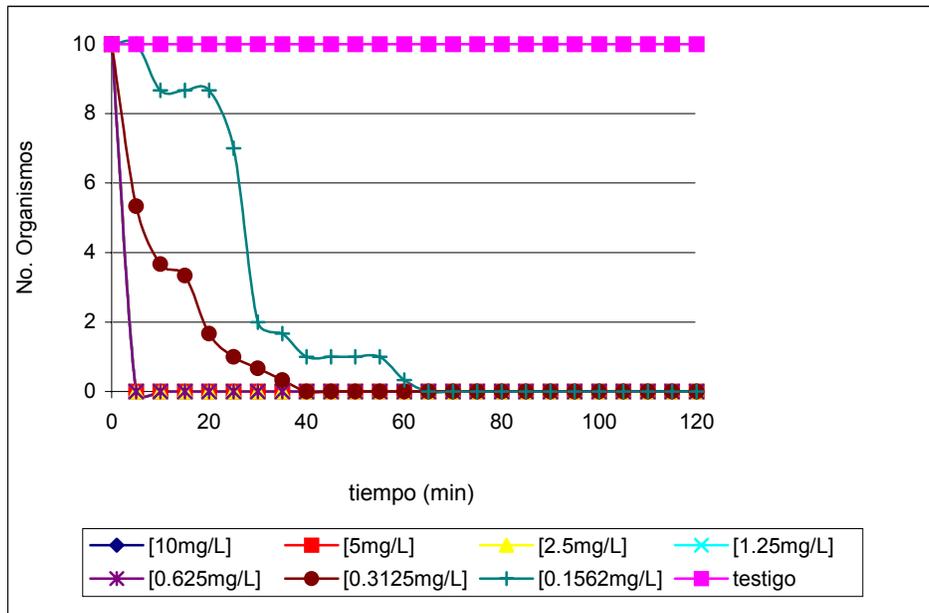


Fig. 45 Exposición de *S. intermedium* a [Ag]

En la Fig. 46, se observa que a la concentración de 0.1367 mg/L de Ag, sobrevivieron 7 organismos durante las 2 horas de exposición.

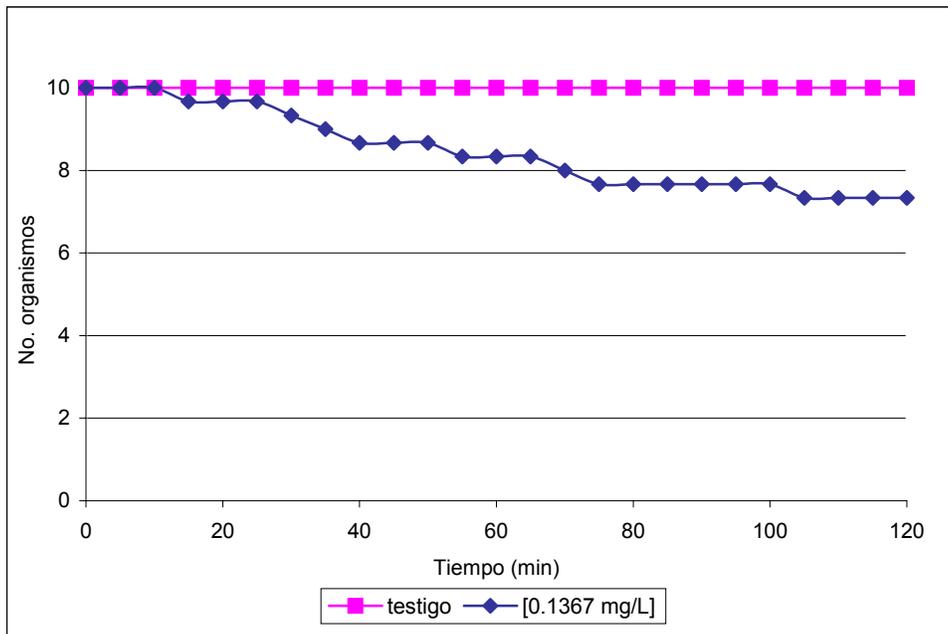


Fig. 46 Exposición de *S. intermedium* a [0.1367 mg/L] de Ag

Finalmente, a la concentración de 0.07812 mg/L lograron sobrevivir los 10 individuos expuestos durante las dos horas de la prueba (Fig. 47).

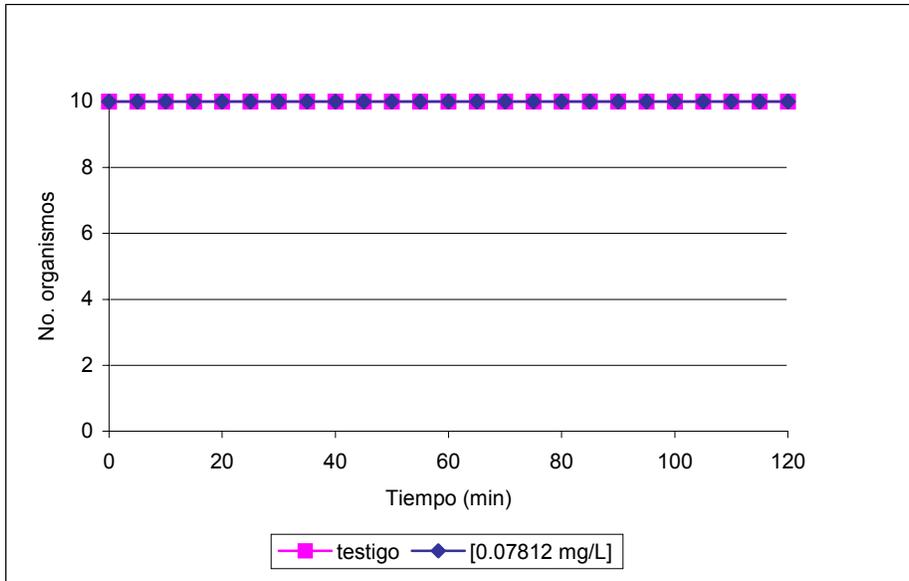


Fig. 47 Exposición de *S. intermedium* a [0.07812mg/L] de Ag

La CL₅₀ calculada mediante Probit, corresponde a la concentración de $0.14687618 \pm 0.00054213$ (Fig. 48).

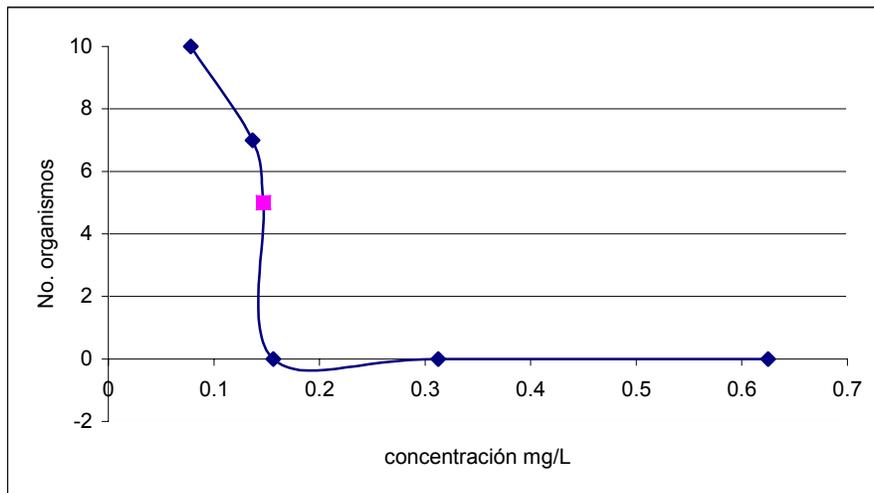


Fig. 48 CL₅₀ obtenida para Ag en *S. intermedium* mediante el método Probit

En la tabla 3 se muestran los valores obtenidos de CL₅₀ y efecto no observable para *S. intermedium*.

Tabla 3. Valores de CL₅₀ y de efecto no observable para *S. intermedium*

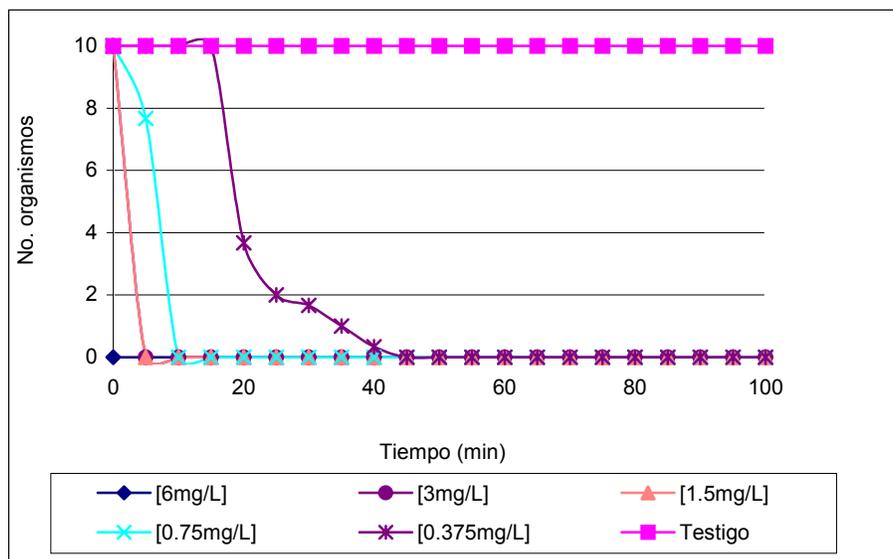
Metal	CL ₅₀ (2Hrs) <i>S. intermedium</i> mg/L	Efecto no observable mg/L
Cu	0.01707 ± 0.00047	0.0117
Cd	0.04014 ± 0.0024	0.0125
Zn	0.00329 ± 0.00021	0.002312
Ag	0.1468 ± 0.00054	0.07812

9.2. Resultados de la evaluación del efecto de Cu, Cd, Zn y Ag en *P. caudatum*

9.2.1 Respuesta de *P. caudatum* a la presencia de Cu

Las concentraciones de Cu empleadas fueron de 0.0937 mg/L a 6mg/L, observándose que a partir de la concentración de 0.1992 mg/L no se produjo algún efecto no observable.

Al exponer a *P. caudatum* a las concentraciones de 6 mg/L, 3 mg/L, 1.5 mg/L, 0.75 mg/L y 0.375 mg/L de Cu, los individuos murieron antes de una hora (Fig.49).

Fig. 49 Exposición de *P. caudatum* a [Cu]

En la Fig.50 se muestra que los ciliados, presentaban alteraciones en el movimiento, ya que giraban constantemente sobre su eje, de manera anormal, y no pudiéndose desplazar normalmente y por lo tanto, se reducía la capacidad del nado, hasta quedar inmóviles, la célula se hinchaba, reducía su tamaño y posteriormente sufría lisis celular.

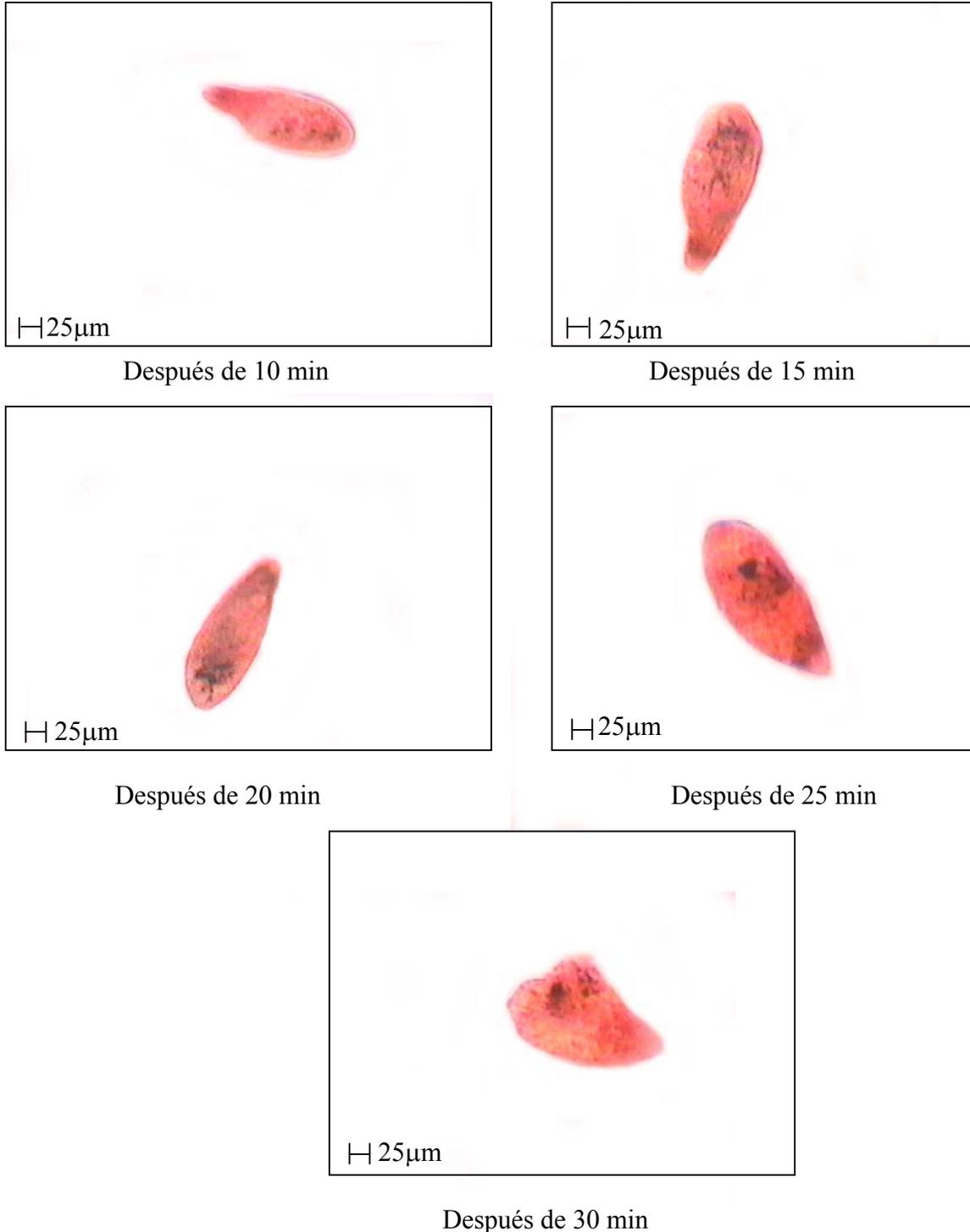


Fig. 50 Cambios morfológicos de *P. caudatum* con [0.375 mg/L] de Cu

A la concentración de 0.20505 mg/L durante la realización de la prueba, solamente un organismo murió (Fig.51).

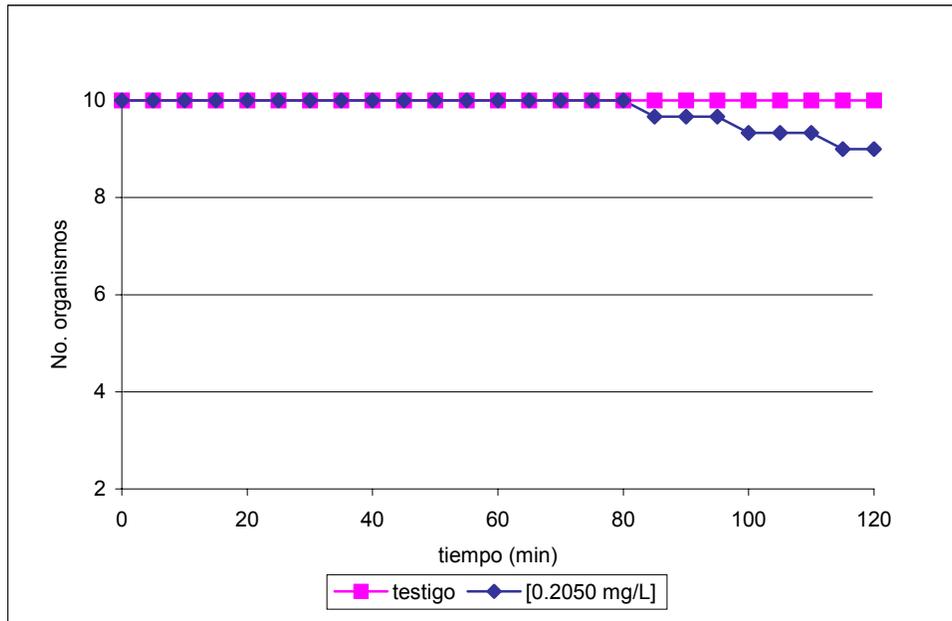


Fig. 51 Exposición de *P. caudatum* a [0.20505 mg/L] de Cu

La concentración a la que todos los organismos expuestos durante las 2 horas fue de [0.1992 mg/L], siendo esta, la concentración en la cual no hay efecto observable (Fig. 52).

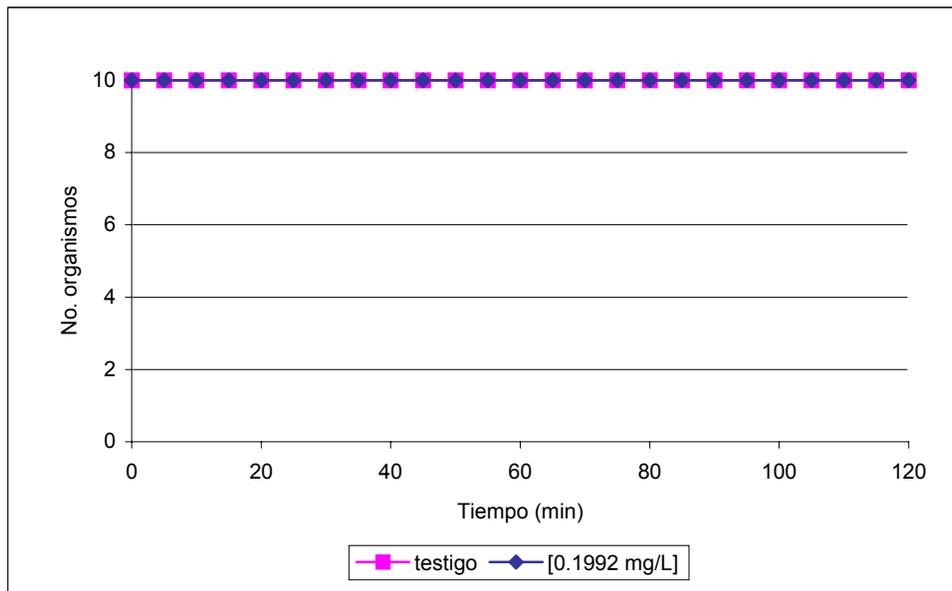


Fig. 52 Exposición de *P. caudatum* a [0.1992] mg/L de Cu

En la Fig. 53 se observa la CL_{50} de 0.3510 ± 0.0102 mg/L calculado para *P. caudatum* expuesto a Cu y concentraciones empleadas.

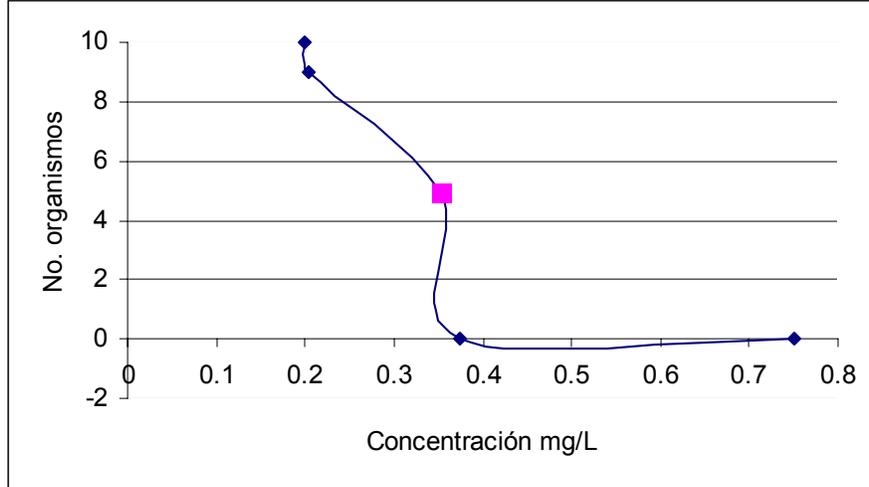


Fig. 53 CL_{50} obtenida para Cu en *P. caudatum* mediante el método Probit

9.2.2 Respuesta de *P. caudatum* a la presencia de Cd

Las concentraciones de Cd empleadas para la realización de las pruebas de toxicidad con *P. caudatum* fueron de 0.025 mg/L a 0.4 mg/L. Siendo la concentración de 0.025 mg/L a la cuál no se observa ningún efecto.

Al exponer a *P. caudatum* a la concentración de 0.4 mg/L, 0.2 mg/L y 0.1 mg/L de Cd se observó que los diez individuos expuestos se murieron antes del término de la prueba (Fig.54).

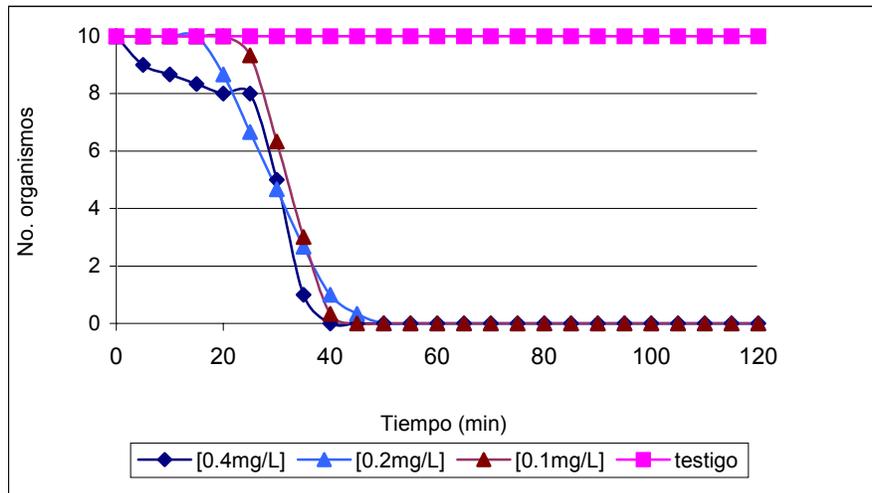


Fig. 54 Exposición de *P. caudatum* con [Cd]

A partir de la concentración de 0.05 mg/L de Cd al termino de las 2 horas de la realización de la prueba sobrevivieron 6 organismos.

En la Fig. 55 se muestra que *P. caudatum* presentó anomalías, ya que reducían su movimiento, solo girando, sin poder desplazarse, perdiendo la capacidad del nado, la célula se hinchaba, y finalmente se producía lisis celular.

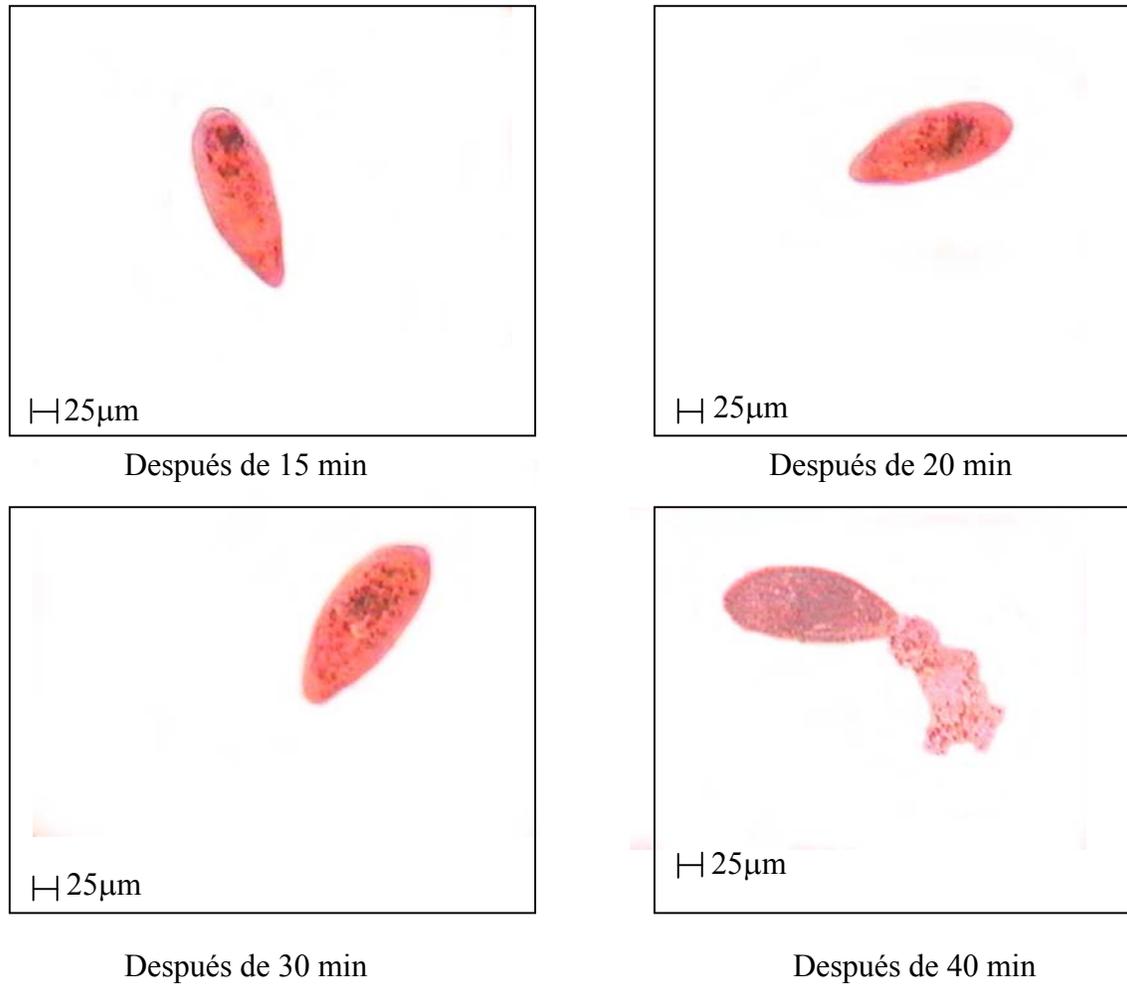


Fig. 55 Cambios morfológicos observados en *P. caudatum* con [0.2 mg/L] de Cd

Finalmente a la concentración de 0.025mg/L, los diez organismos expuestos sobrevivieron de manera satisfactoria. Fig. 56

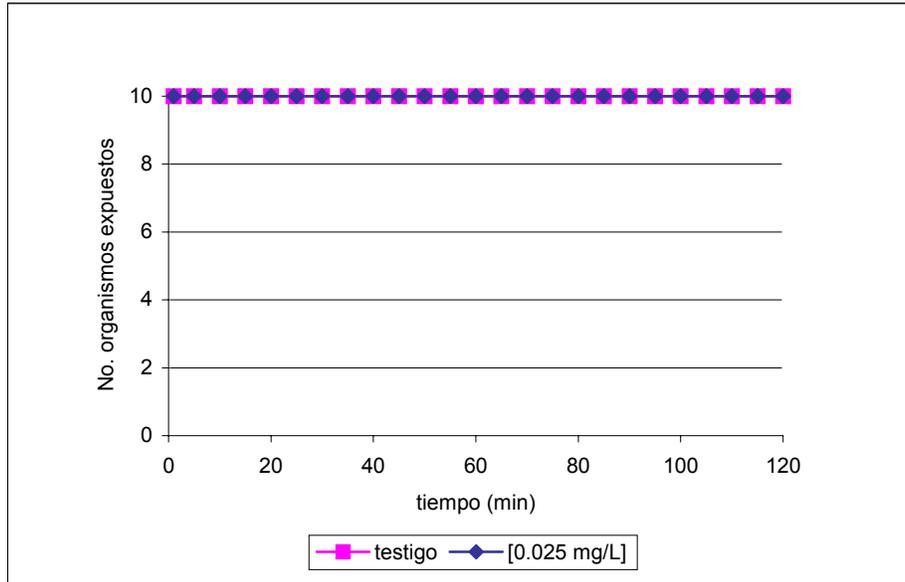


Fig. 56 Exposición de *P. caudatum* a [0.025mg/L] de Cd

El valor de CL_{50} obtenido a partir del cálculo Probit fue de 0.055 ± 0.001 lo cual se puede observar en la Fig. 57

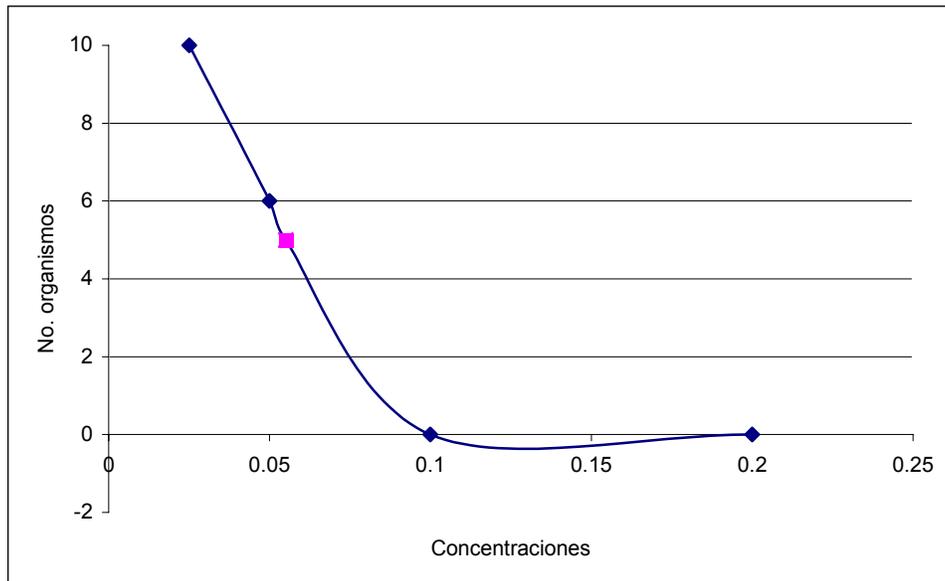


Fig. 57 CL_{50} obtenida para Cd en *P. caudatum* mediante el método Probit.

9.2.3 Respuesta de *P. caudatum* a la presencia de Zn

Las concentraciones empleadas de Zn fueron de 0.00462 mg/L a 20mg/L, la concentración mínima utilizada y a la que los 10 organismos expuestos lograron sobrevivir fue 0.00462 mg/L

Al exponer a *P. caudatum* a la concentración de 20 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, 2.5 mg/L, 1.25 mg/L, 0.625 mg/L, 0.3125 mg/L, 0.15625 mg/L, 0.078125 mg/L y 0.03906 mg/L. Se observó que los 10 individuos murieron antes de 10 minutos (Fig.58)

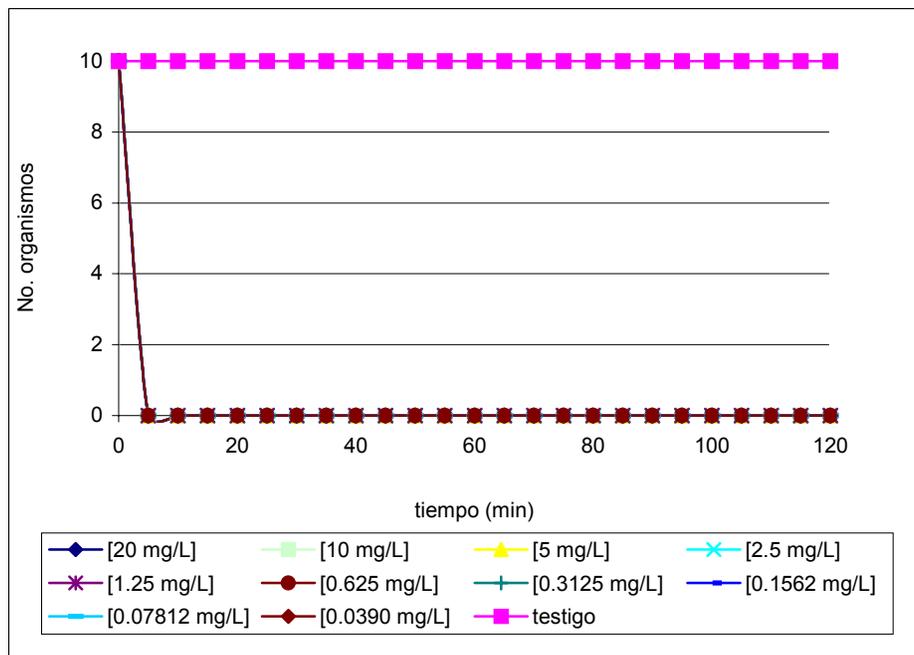


Fig. 58 Exposición de *P. caudatum* a [Zn]

En la Fig. 59 se muestra que a la concentración de 0.01953 mg/L, solamente un organismo logró sobrevivir durante las dos horas en las que se desarrolló la prueba.

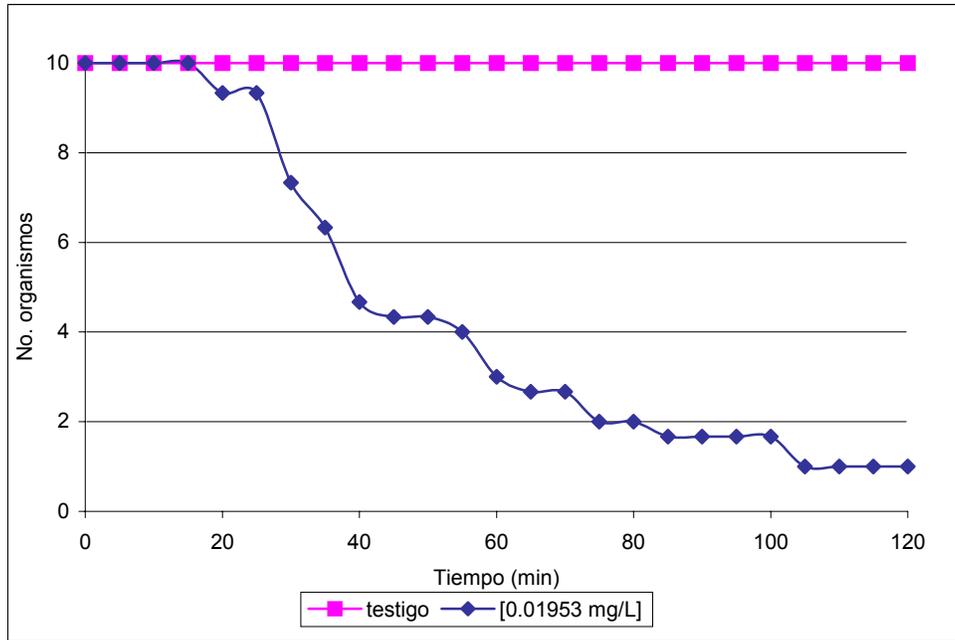


Fig. 59 Exposición de *P. caudatum* a [0.01953 mg/L] de Zn.

A la concentración de [0.0170 mg/L], al finalizar la prueba, lograron sobrevivir 6 organismos (Fig. 60).

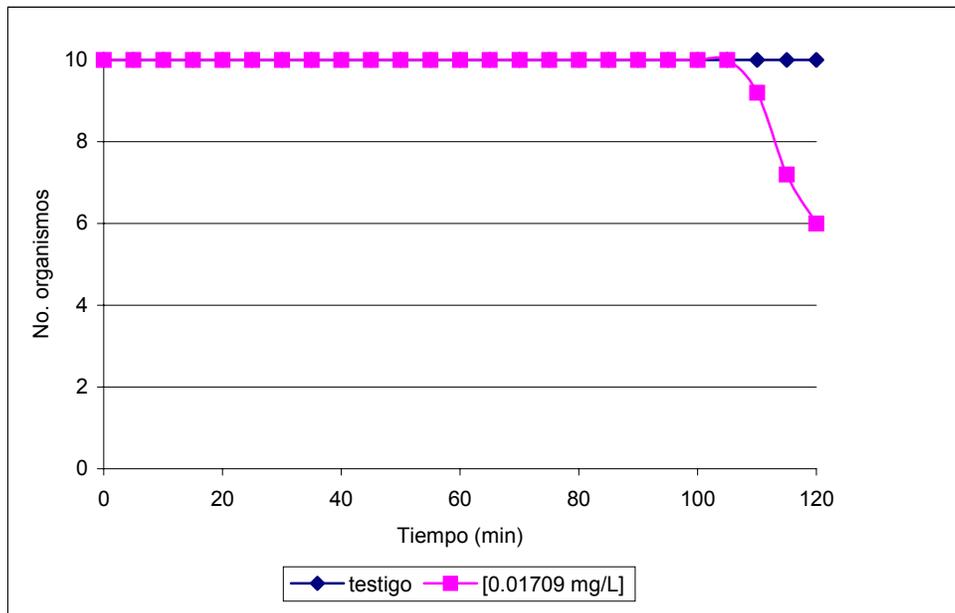


Fig.60 Exposición de *P. caudatum* a [0.0170 mg/L] de Zn

Como se observa en la Fig. 61 a la concentración de [0.00976 mg/L] al termino de la prueba, solamente se observó la muerte de un organismo.

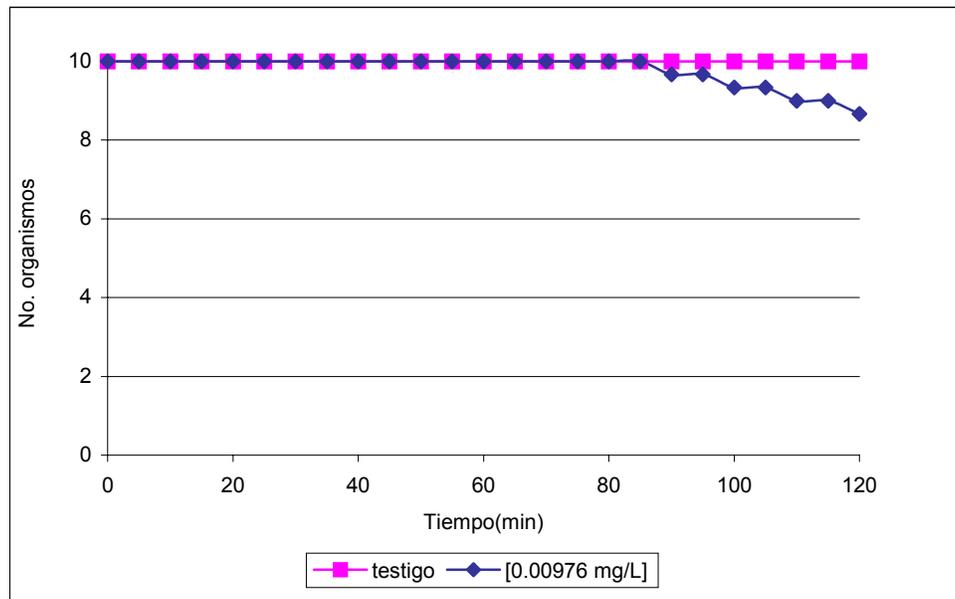


Fig. 61 Exposición de *P. caudatum* a [0.00976 mg/L] de Zn

Los ciliados sufrían deformaciones, ya que se hinchaban, y reducían notablemente su movimiento y al final se producía lisis celular (Fig.62).

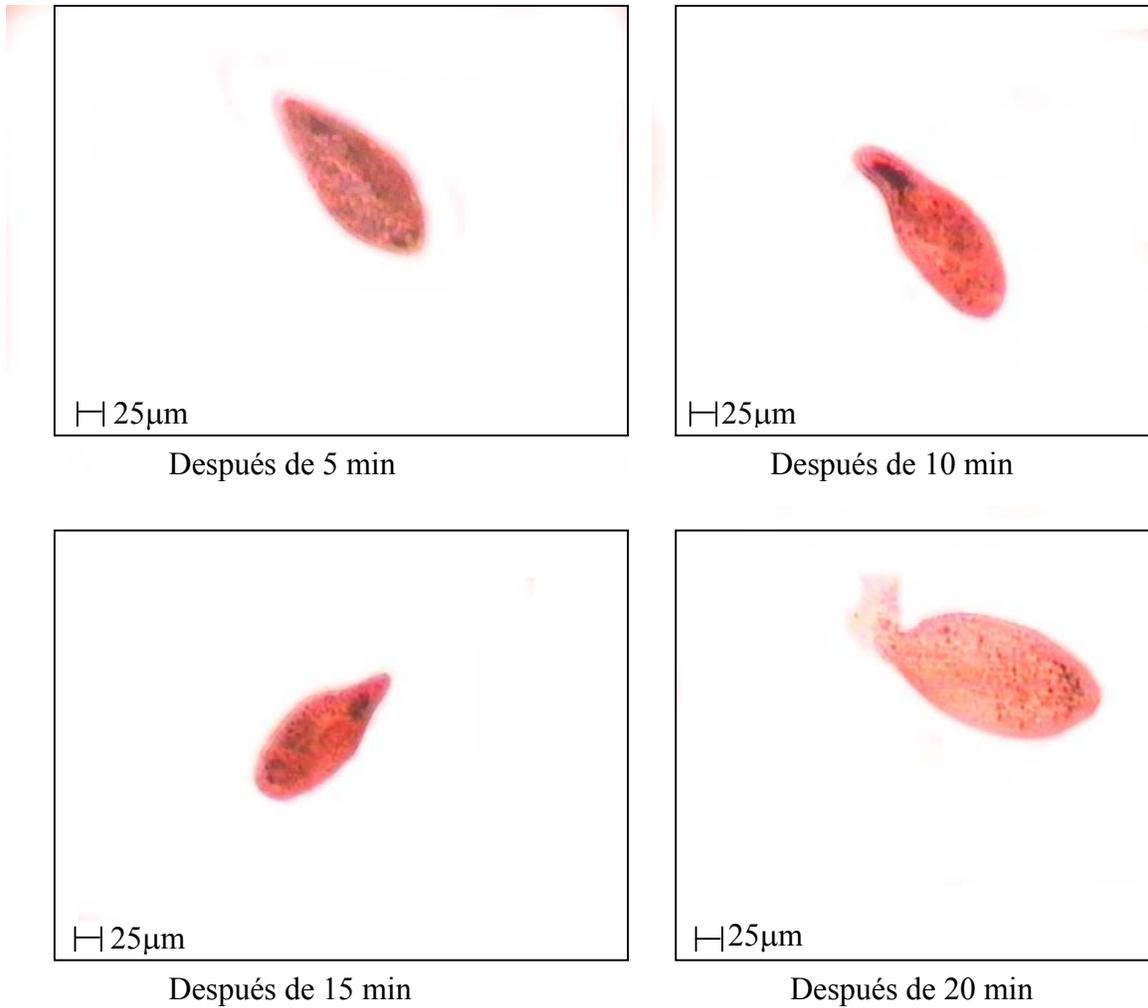


Fig.62 Cambios morfológicos observados en *P. caudatum* con [0.039 mg/L] de Zn

En Fig. 63 se observa que finalmente a la concentración de [0.00425 mg/L], los 10 organismos expuestos lograron sobrevivir de manera adecuada siendo esta concentración el valor del efecto no observable.

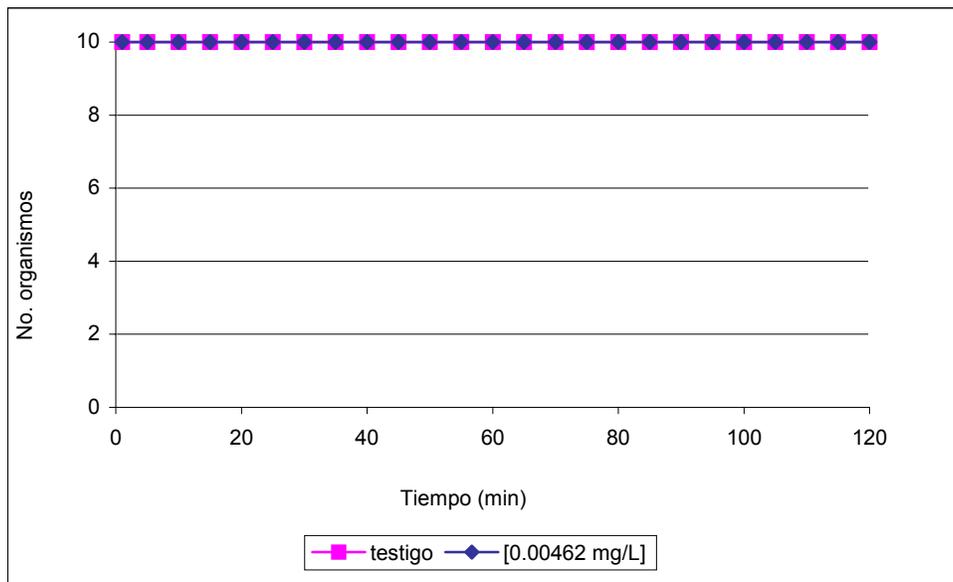


Fig. 63 Exposición de *P. caudatum* a [0.004625 mg/L] de Zn

En la Fig.64 se observa el valor de CL_{50} obtenido mediante el calculo Probit fue de 0.01454 ± 0.00038 y concentraciones empleadas durante en las pruebas.

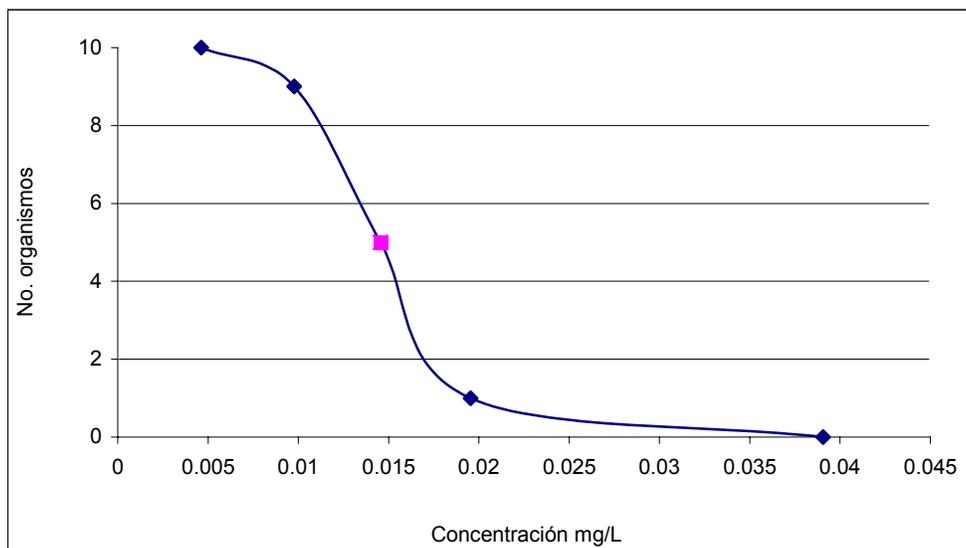


Fig. 64 CL_{50} obtenida para Zn en *P. caudatum* mediante el método Probit

9.2.4 Respuesta de *P. caudatum* a la presencia de Ag

Las concentraciones de Ag empleadas fueron de 0.1171 mg/L hasta 10 mg/L, el primer valor fue la concentración mínima utilizada en la que los 10 organismos expuestos sobrevivieron de manera satisfactoria, por lo que este es el valor que corresponde al efecto no observable.

Al exponer a *P. caudatum* a la concentración de 10 mg/L, 5 mg/L, 2.5 mg/L, 1.25 mg/L y 0.3125 mg/L se observó que los 10 individuos de *P. caudatum* murieron antes de los 10 minutos casi manera instantánea (Fig. 65).

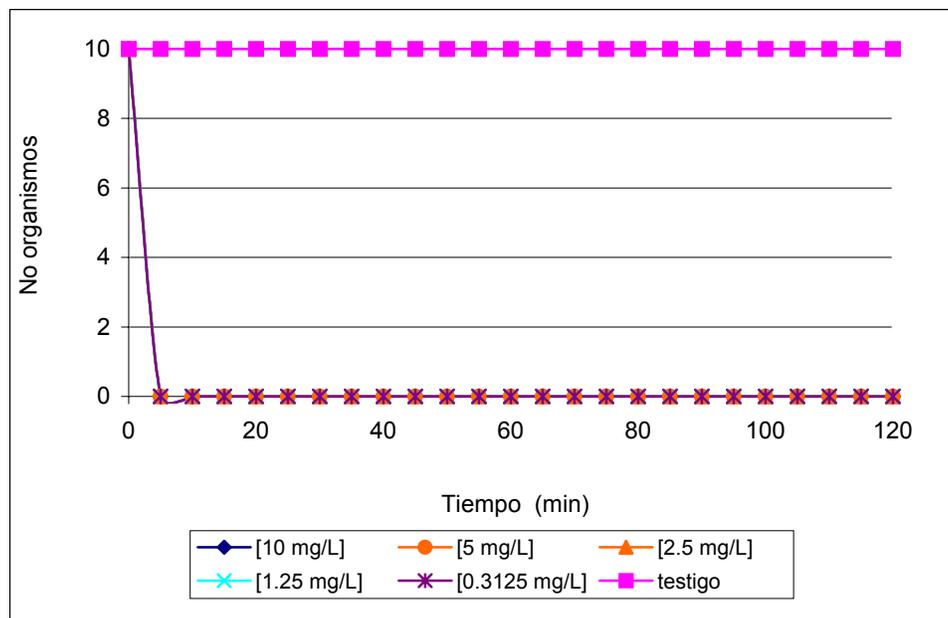


Fig. 65 Exposición de *P. caudatum* a [Ag]

En la Fig. 66 se muestra que a partir de la concentración de 0.136793 mg/L se observó que 8 organismos lograron sobrevivir al término de las 2 horas de exposición.

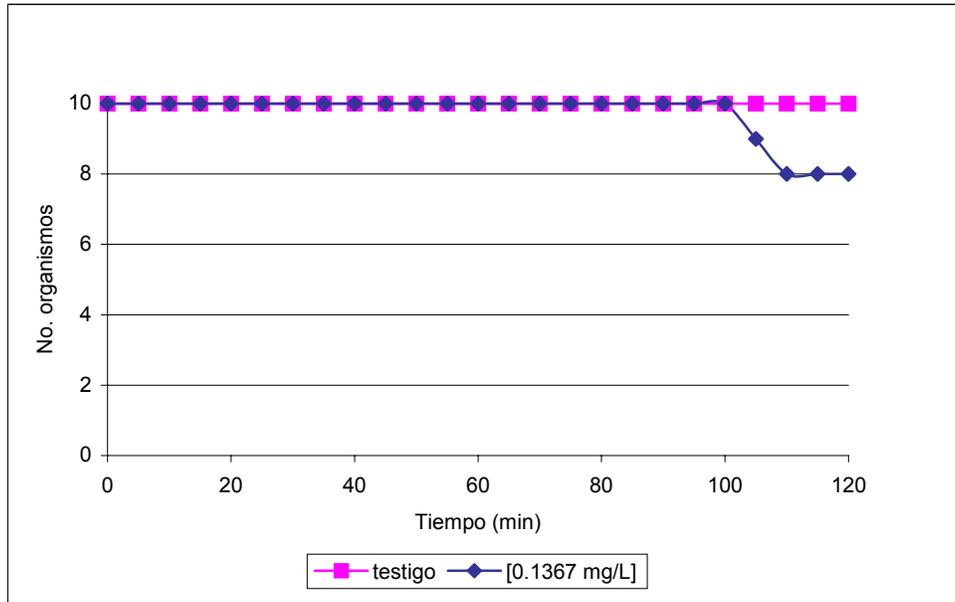


Fig. 66 Exposición de *P. caudatum* a [0.1367 mg/L] de Ag

En la Fig.67 se observan las anomalías que presentaban los ciliados tales como: movimiento lento, hinchados, alteraciones en las vacuolas contráctiles y finalmente presentaban lisis celular.

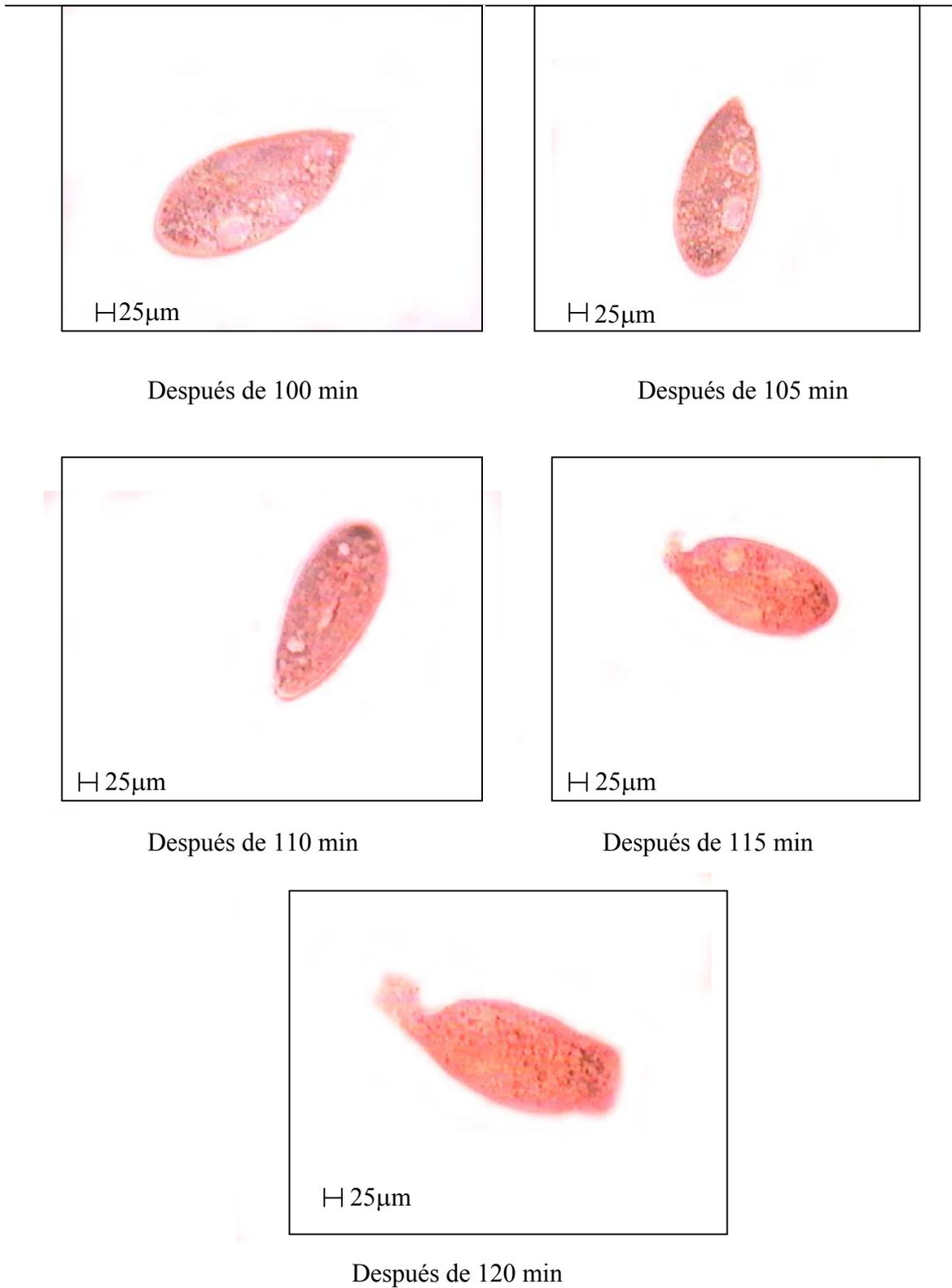


Fig. 67 Cambios morfológicos de *P. caudatum* con [0.136 mg/L] de Ag

Finalmente a la concentración de 0.1171 mg/L de Ag, los 10 organismos expuestos logran vivir de manera satisfactoria el cual corresponde al valor del efecto no observable (Fig.68).

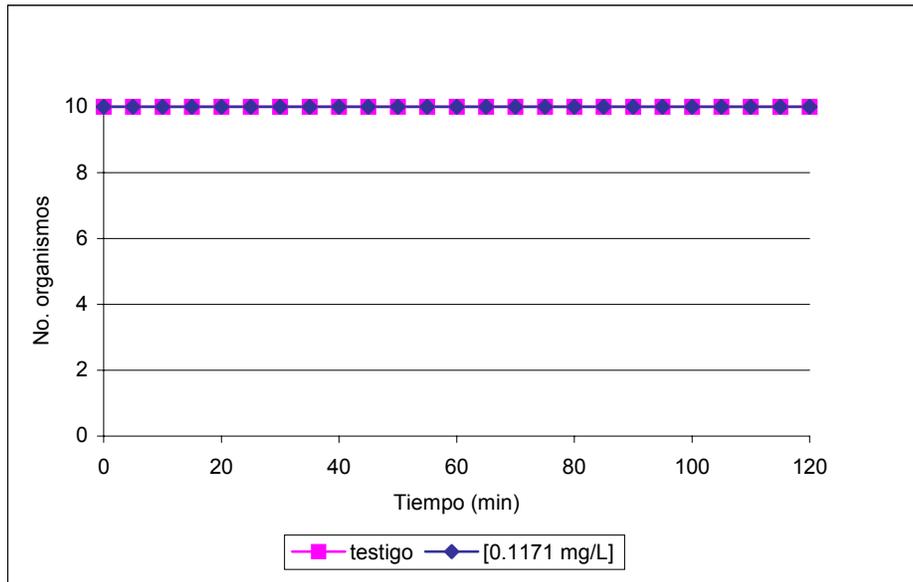


Fig. 68 Exposición de *P. caudatum* a [0.1171 mg/L] de Ag

La CL₅₀ obtenida mediante cálculo Probit fue de 0.1793 ± 0.0017 (Fig. 69).

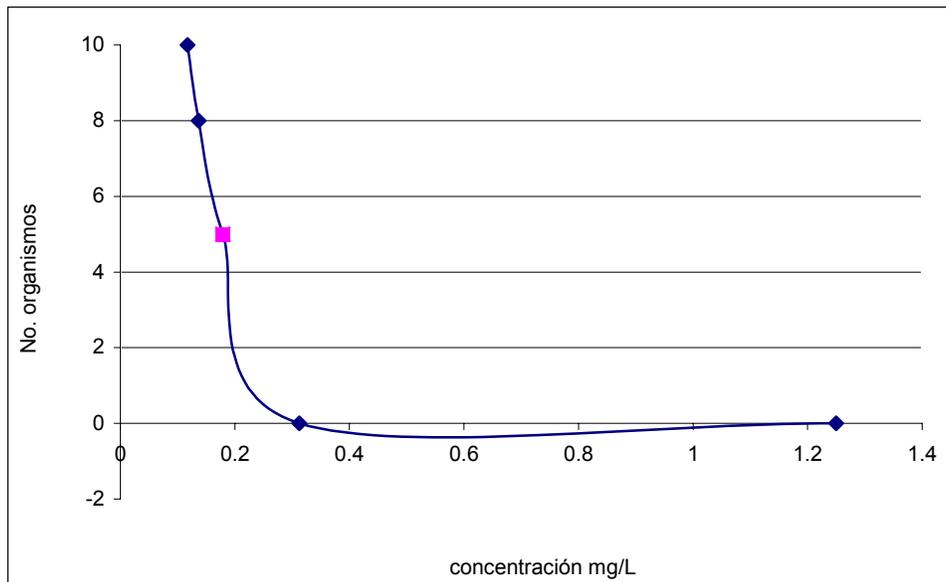


Fig. 69 CL₅₀ para Ag en *P. caudatum* mediante el método Probit

En la tabla 4 se muestran los valores obtenidos de CL_{50} y el valor de la concentración del efecto no observable para *P. caudatum*.

Tabla 4. CL_{50} y Concentración de efecto no observable para *P. caudatum*.

Metal	CL_{50} (2 horas) mg/L	Concentración del Efecto no observable. mg/L
Cu	0.3510 ± 0.0102	0.1992
Cd	0.055 ± 0.001	0.025
Zn	0.01454 ± 0.00038	0.00462
Ag	0.1793 ± 0.0017	0.1171

En la tabla 5 se muestran los valores obtenidos de CL_{50} y de efecto no observable, para *S. intermedium* y *P. caudatum*.

Tabla 5. Valores obtenidos para *S. intermedium* y *P. caudatum*

Metal	CL_{50} (2 horas) <i>S. intermedium</i> mg/L	Efecto no observable <i>S. intermedium</i> mg/L	CL_{50} (2 horas) <i>P. caudatum</i> mg/L	Efecto no observable <i>P. caudatum</i> . mg/L.
Cu	0.01707 ± 0.00047	0.0117	0.3510 ± 0.0102	0.1992
Cd	0.04014 ± 0.0024	0.0125	0.055 ± 0.001	0.025
Zn	0.00329 ± 0.00021	0.002312	0.01454 ± 0.00038	0.00462
Ag	0.1468 ± 0.00054	0.07812	0.1793 ± 0.0017	0.1171

10. DISCUSIÓN

10.1 Respuesta de *S. intermedium* a la exposición de diferentes metales

Los datos indican que los metales empleados para la realización de las pruebas de toxicidad aguda con Cu, Cd, Zn y Ag demostraron ser muy tóxicos para *S. intermedium* ya que los valores obtenidos de CL_{50} son 0.01707 ± 0.00047 , 0.04014 ± 0.0024 , 0.00329 ± 0.00021 , 0.1468 ± 0.00054 respectivamente.

Dado que este microorganismo, es uno de los grupos más abundantes que se encuentra en los cuerpos de agua y que presenta una rápida respuesta a nivel morfológico a cambios ambientales provocados por estrés antropogénico, podría ser empleado como bioindicador en dicho ambiente.

Al realizar las pruebas de toxicidad, empleando a este organismo, se observa que se requieren concentraciones mínimas para afectarlo, incluso muy por debajo de los valores establecidos en la NOM-001-SEMARNAT-1996.

Los organismos, al ser expuestos, a dichos metales, presentaban alteraciones morfológicas, tales como: disminución del nado, inhibición de movimiento, encorvamiento de las células, vacuolización del citoplasma y lisis celular, siendo el Zn el elemento, que resulto ser el más tóxico para estos organismos, y el elemento que resulto ser el menos tóxico de los 4 empleados fue Ag.

Estos efectos observados, coinciden con los reportados por Martín-González *et al.*, (2005a), en cuanto a que los metales provocan desorganización osmótica, dando como resultado alteraciones membranales, dicho mecanismo de alteración, se presenta especialmente en organismos sin pared celular como lo son los ciliados. Otro efecto reportado por la exposición a metales son los trastornos mitocondriales, siendo el principal efecto la autofagia, lo cual se relaciona con la muerte celular debido a la necrosis y apoptosis, así que se considera que la autofagia es el mecanismo degradador de la mitocondria, inducida por los metales. Si ésta es muy intensa, la célula muere mediante lisis, (Martín-González *et al.*, 2005a y b) por lo que esto podría explicar el motivo por el cual las células de este experimento, sufrieron lisis.

Con lo que respecta a las modificaciones que presentó *S. intermedium* en el nado, podría ser explicado, debido a que se ha reportado que los metales perturban los canales de calcio

(Fisher y Hook, 2002; Manzl *et al.*, 2003), cabe señalar que el avance y retroceso de los cilios, esta relacionado con el flujo de calcio, así que al exponer a los organismos a metales pesados, bloquean los canales de calcio, y provocan la perturbación del movimiento de los cilios.

El orden de toxicidad que presento *S. intermedium* ante la exposición de los metales fue: Zn>Cu>Cd>Ag.

Contrario a lo que se esperaba, el Zn resulto ser el elemento más tóxico y la Ag el elemento menos tóxico, se pensaba que el Cd, y la Ag iban a ser los elementos con mayor toxicidad, debido a que se ha reportado que el Cd es uno de los elementos más tóxicos y Ag al ser empleada como desinfectante se esperaba que presentara una toxicidad mayor. Posiblemente el Zn, resulto ser el metal más tóxico para los organismos, debido a que al ser un micronutriente esencial, es más fácil que penetre de manera abundante a través de la membrana, provocando que se exceda la concentración umbral, y se convierta en un metal sumamente tóxico para estos organismos. A pesar de que en muchos organismos se considera que el Zn es el elemento menos tóxico, se ha reportado que para *Tetrahymena pyriformis* es uno de los más tóxicos (Nicolau *et al.*, 1999, 2001), en contraste con otros estudios, donde el cobre es sistemáticamente considerado más tóxico que el Zn para los protozoos (Madoni *et al.*, 1992, 1994, 1996).

Por lo que *S. intermedium* presenta alta sensibilidad a la exposición de Cu, Cd, Zn y Ag.

10.2 Respuestas de *P. caudatum* a la exposición a diferentes metales

Durante la realización de las pruebas de toxicidad aguda, los valores obtenidos de CL₅₀, para Cu, Cd, Zn y Ag son: 0.3510 ± 0.0102 , 0.055 ± 0.001 , 0.1454 ± 0.00038 , 0.1793 ± 0.0017 respectivamente, observándose, que *P. caudatum* es altamente sensible a la exposición de dichos metales, incluso al exponerlo a concentraciones sumamente inferiores a las establecidas en la NOM-001-SEMARNAT-1996. En cuanto a las alteraciones morfológicas, que presentaron los organismos al ser expuestos a los diferentes metales, las frecuentes fueron: disminución del tamaño y de la velocidad del nado, vacuolización del citoplasma, deformaciones morfológicas, y posteriormente lisis celular.

El orden de toxicidad para este organismo fue: Zn>Cd>Ag>Cu. Al igual que en el caso de *S. intermedium*, el elemento Zn resulto ser el más tóxico y el menos tóxico resulto ser Cu, Como el caso de *S. intermedium*, los cambios morfológicos en *P. caudatum*, se deben a que estos ciliados, presentaron alteraciones en la organización osmótica, debido que los metales provocan alteraciones membranales (Martín-González *et al.*, 2005a). Presentándose posteriormente la muerte celular mediante lisis. En cuanto a la perturbación del movimiento, se ha reportado que se debe a que los metales perturban los canales de calcio (Fisher y Hook, 2002; Manzl *et al.*, 2003), por lo que esta alteración producía que se desplazaran de manera anormal comparados con el control.

10.3 Uso potencial de *S. intermedium* y *P. caudatum* para evaluar la presencia de metales pesados

Las especies empleadas para la realización de este trabajo, presentan ventajas, con respecto a otros organismos usados para la realización de pruebas de toxicidad aguda, por ejemplo, no se requiere la presencia de grandes cantidades del contaminante, debido a que poseen gran sensibilidad, pudiéndose observar el efecto del contaminante casi de manera inmediata, y el tiempo de realización de la prueba es de 2 horas. Siendo microorganismos eucariontes, es posible que los efectos observados, puedan predecir el riesgo que representan para organismos superiores, además de que forman parte importante de la cadena alimentaria. Debido a lo anterior, se propone utilizar a *S. intermedium* y *P. caudatum* en la evaluación del efecto inducido por metales pesados presentes en cuerpos de agua y es factible que estos microorganismos sean empleados para la evaluación de metales pesados en el caso de cuerpos de agua y en las plantas de tratamiento respectivamente.

Sin embargo *S. intermedium*, presenta mayor sensibilidad a los metales que *P. caudatum*, ya que los valores de CL₅₀ y de concentración de efecto no observable (tabla 5). En la literatura se ha reportado que especies pertenecientes al genero *Spirostomum* presentan gran sensibilidad a la exposición a metales pesados. Algunos estudios toxicológicos han demostrado que en el caso de la especie *S. teres* presenta gran sensibilidad a los metales pesados tales como. Ni, Cu, Hg y Zn (Twagilimana *et al.*, 1998; Madoni, 2000). Otros estudios realizados también demuestran que la especie *S. ambigum* presenta gran sensibilidad a los metales pesados (Nalecz-Jawecki y Sawicki, 1999, 2002). Por lo que la

gran sensibilidad de este género, queda confirmada con los datos obtenidos en este trabajo al exponer a otra especie del género *Spirostomum* a metales como Cu, Cd, Zn y Ag. En datos de literatura concernientes a la toxicidad aguda de metales pesados en ciliados, (Madoni *et al.*, 1992,1994 y Twagilimana *et al.*,1998) establece las siguientes CL₅₀ (24 horas) para *S. teres* y *P. caudatum* (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de CL₅₀(24 horas)para *Spirostomum* y *Paramecium*

Metal	Madoni		Twagilimana	Este estudio			
	CL ₅₀ <i>S. teres</i> (24 h)mg/L	CL ₅₀ <i>P. caudatum</i> (24 h)mg/L	CL ₅₀ <i>S. teres</i> (24-h) mg/L	CL ₅₀ <i>S.</i> <i>intermedium</i> (2h) mg/L	Efecto no observable mg/L	CL ₅₀ <i>P. caudatum</i> (2 h)mg/L	Efecto no observable
Cu	0.00351	0.01	0.037	0.01707	0.0117	0.351	0.1992
Cd	0.557	0.18	1.95	0.04014	0.0125	0.055	0.025
Zn	0.672	2.5	8.93	0.00329	0.002312	0.01454	0.00462
Ag	-----	-----	-----	0.1468	0.07812	0.1793	0.1171

Los valores obtenidos en este trabajo, muestran que *S. intermedium* y *P. caudatum*, presentaron mayor sensibilidad, comparados con los valores obtenidos por Madoni *et al.*, (1992, 1994) así como los valores obtenidos por Twagilimana *et al.*, (1998) muestran menor sensibilidad que los reportados en este trabajo, la diferencia de valores obtenidos en este trabajo respecto con los de Madoni *et al.*, (1992, 1994) posiblemente se deben a que los resultados que obtuvo este autor son bajo condiciones de campo, en una comunidad de lodos activados, por lo que los organismos están expuestos a diferentes tóxicos y se ha reportado que se pueden volver más tolerantes a los contaminantes, mientras que en el presente estudio, *S. intermedium* y *P. caudatum* fueron cultivados en medios específicos para su sobrevivencia, y se llevaron a aclimatación en condiciones de laboratorio y libres de cualquier exposición a contaminantes antes de realizar las pruebas. Otro factor importante, es que empleó a los metales en forma de cloruros, en el caso de Twagilimana *et al.*, (1998), el Cu, lo empleo en forma de sulfato, el Cd en forma de cloruro y el Zn en forma de sulfato, recordando que en este trabajo, se emplearon en forma de nitratos. Esto puede explicar parcialmente las diferencias en las concentraciones obtenidas en los dos trabajos.

Spirostomum intermedium y *Paramecium caudatum* son buenos candidatos para ser empleados como bioindicadores para detectar la presencia de metales pesados: *S. intermedium* puede ser empleado en cuerpos de agua y *P. caudatum* en efluentes con mayor cantidad de materia orgánica como lo son los de las plantas de tratamiento, además de que pueden ser incluidos en baterías de prueba. Estos microorganismos eucariontes poseen un gran potencial para ser empleados como herramientas útiles en beneficio de los ecosistemas.

11. CONCLUSIONES

- ❖ Los valores de CL₅₀ de Cu, Cd, Zn y Ag para *S. intermedium* son de 0.01707 mg/L, 0.04014 mg/L, 0.00329 mg/L, 0.1468 mg/L, respectivamente, mientras que los valores del efecto no observable fueron: 0.0117 mg/L, 0.0125mg/L, 0.002312 mg/L, 0.07812 mg/L.
- ❖ Los valores de CL₅₀ de Cu, Cd, Zn y Ag para *P. caudatum* son de 0.3510 mg/L, 0.055 mg/L, 0.01454 mg/L, 0.1793 mg/L respectivamente, en tanto que los valores del efecto no observable son: 0.1992 mg/L, 0.025 mg/L, 0.00462 mg/L, 0.1171 mg/L.
- ❖ El orden de toxicidad para *S. intermedium* fue de: Zn>Cu>Cd>Ag, mientras que para *P. caudatum* fue de: Zn>Cd>Ag>Cu.
- ❖ *S. intermedium* y *P. caudatum* presentaron alta sensibilidad a la exposición de metales pesados, por lo que pueden ser utilizados como bioindicadores, sin embargo, la sensibilidad de *S. intermedium* fue mayor.
- ❖ *S. intermedium* y *P. caudatum* pueden ser considerados como organismos de prueba útiles para la ejecución de ensayos de toxicidad estándar para ambientes acuáticos.
- ❖ La alta sensibilidad a bajas concentraciones de metales pesados, incluso muy por debajo de los valores mínimos establecidos en la NOM-001, *S. intermedium* y *P. caudatum*, se pueden considerar como una herramienta analítica para el control de calidad de cuerpos de agua naturales y de efluentes de plantas de tratamiento, respectivamente.
- ❖ El bajo costo, la alta sensibilidad, la rapidez, y la implementación de pruebas de toxicidad aguda con *S. intermedium* y *P. caudatum*, los hace una buena herramienta para ser considerados bioindicadores en la detección de metales pesados en cuerpos de agua y efluentes de plantas de tratamiento.

12. LITERATURA CITADA

Abraham J, Butler R y Sigeo D. (1997). Ciliate populations and metals in an activated-sludge plant. *Water Res.* 31(5):1103-1111.

Aladro-Lubel M, Martínez M y Mayén-Estrada R. (1990). Manual de ciliados psamofilos marinos y salobres de México. Cuadernos 9. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 167 pp.

Albert L. (1997). Introducción a la Toxicología ambiental. Centro Panamericano de Ecología humana y Salud. División de Salud y Contaminación ambiental. Metepec, Estado de México.

APHA, AWWA y WEF. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition. Clesceri LS, Greenber AE, Eaton Ad, Editors. USA. 1033 pp.

Boëchat I y Adrian R. (2005). Biochemical composition of algivorous freshwater ciliates: You are not what you eat. *Fems Microbiol. Ecol.* 53:393-400.

Castro P. (2004). Evaluación de la toxicidad de lixiviados de recorte de perforación sobre el ciliado edafícola *Colpoda cucucllus*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 90 pp.

Castillo (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del agua. 188 pp.

Cervantes C y Moreno-Sánchez R. (1999). Contaminación ambiental por metales pesados Impacto en los seres vivos. A.G.T. Editor. México. D.F. 157 pp.

Coello MD, Sales D y Quiroga JM. (2002). Toxic effects of metals on microbial activity in the activated sludge process. *Chem. Biochem. Eng Q.* 16(3) 139-144.

Coppellotti O. (1994). Effects of cadmium on *Uronema marinum* (Ciliophora, Scuticociliatida) from Antarctica. *Acta Protozool.* 33:159-167.

Curds C y Cockburn A. (1970). Protozoa in biological sewage-treatment processes II. Protozoa as indicators in the activated-sludge process. *Wat. Res.* 4:237-249.

Damek-Poprawa M y Sawicka-Kapusta K. (2003). Damage to the liver, kidney, and testis with reference to burden of heavy metals in yellow-necked mice from areas around steelworks and zinc smelters in Poland. *Toxicology.* 186:1-10.

Davydova S. (2005). Heavy metals as toxicants in big cities. *Microchem J.* 79:133-136.

Decamp O, Warren A y Sanchez R. (1999). The role of ciliated protozoa in subsurface flow wetlands and their potential as bioindicators. *Water. Sci. Technol.* 40(3):91-98.

Ekelund F, Olsson S y Johansen A. (2003). Changes in the succession and diversity of protozoan and microbial populations in soil spiked with a range of copper concentrations. *Soil Biol. Biochem.* 35:1507-1516.

Fent K. (2003). Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol. Lett.* 140-141:353-365.

Fernández-Leborans G y Novillo A. (1995). The effects of cadmium on the successional stages of a freshwater protozoa community. *Ecotox Environ Safe.* 31:29-36.

Fernández-Leborans G y Novillo A. (1993). Changes in trophic structure of a freshwater protozoan community subjected to cadmium. *Ecotox. Environ Saf.* 25:271-279.

Fisher N y Hook S. (2002). Toxicology tests with aquatic animals need to consider the trophic transfer of metals. *Toxicology.* 181-182:531-536.

Fleeger J, Carman K y Nisbet R. (2003). Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 317:207-233.

Foissner W, Blattere H, Berger H y Kohmann F. (1991). Taxonomische und ökologische revision der ciliaten des saprobien systems. Band I: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea. *Informationsberichte des bayer. Landesamtes für Wasserwirtschaft*, 1/91: 478. pp.

Ford B. (1986). Hibernatory behaviour of the Heterotrichian protozoan *Spirostomum* (Ehrenberg). *Microscopy.* 35:362-364.

Friberg L., Nordberg G. y Vouk V. (1990). *Handbook on the Toxicology of Metals*. 2nd edition. Volume II: Specific Metals. Ed. Elsevier Science Publishers. 704. pp.

Gaetke L, y Kuang C. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 189:147-163.

García JV, Durán de Bazúa MC y Luna-Pabello VM. (1997). Guía para la aplicación de la prueba de toxicidad empleando *Tetrahymena pyriformis*. Serie: Química ambiental del agua. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. 43pp.

Golhaber S.(2003). Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regul. Toxicol. Pharm.* 38:232-242.

Gonda K, Yoshida A, Oami K y Takahashi M. (2004). Cetrin is essential for the activity of the ciliary reversal-coupled voltage Ca²⁺ channels. *Biochem. Bioph Res Co.* 323:891-897.

Goyer R. (1997). Toxic and essential metal interactions. *Annu. Rev. Nutr.* 17:37-50.

Gracia M. Salvadó H, Ruis M y Amigo J. (1994). Effects of copper on ciliate communities from Activated Sludge plants. *Acta Protozool.* 33:219-226.

Hernando M , Fernández-Alba , Tauler R y Barceló D (2005). Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65:358-366.

Hoffman R y Atlas R. (1987). Measurement of the effects of cadmium stress on protozoan grazing of bacteria (bacterivory) in activated sludge by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (10):2440-2444.

Husser M, Hardt M, Blanchard M, Hentschel, Klauke N y Plattner H. (2004). One-way calcium spill-over during signal transduction in *Paramecium* cells: from the cell cortex into cilia, but not in the reverse direction. *Cell calcium.* 36:349-358.

Ishihara T, Kobayashi E, Okubo Y, Suwazono Y, Kido T, Nishijyo M, Nakagawa H y Nogawa K. (2001). Association between cadmium concentration in rice and mortality in the Jinzu River basin, Japan. *Toxicology.* 163:23-28.

Jones E.E.(1974). The protozoa of mobile Bay Alabama. University of South Alabama. Vol 1. No.1. United States of America.

Kakkar P y Jaffery F. (2005). Biological markers for metal toxicity. *Environ Toxicol Phar.* 19:335-349.

Karri S, Sierra-Alvarez R y Field J. (2005). Toxicity of copper to acetoclastic and hydrogenotrophic activities of methanogens and sulfate reducers in anaerobic sludge. *Chemosphere.* (en prensa).

Karvelas M, Katsoyiannis A y Samara C. (2003). Occurrence and fate of heavy metals in the wastewater treatment process. *Chemosphere* 53:1201-1210.

Kasuya M. (2000). Recent epidemiological studies on itai-itai disease as a chronic cadmium poisoning in Japan. *Water Sci Technol.* 42:147-155.

Kato Y, Mogami Y y Baba S. (2005). Longevity of a *Paramecium* cell clone in space: Hypergravity experiments as a basis for microgravity experiments. *Adv. Space Res.* (en prensa).

Kimura N y Mikami K. (2003). Interactions between newly developed macronuclei and maternal macronuclei in sexually immature multinucleate exconjugants. *Differentiation* 71: 337-345.

Kudo R (1977). *Protozoology*. 5° edition. Ed. Thomas Publisher. United States of America. 626 pp.

Larison J, Likens G, Fitzpatrick J y Crock J. (2000). Cadmium toxicity among wildlife in the Colorado Rocky Mountains. *Nature*. 406:181-183.

Laybourn-Parry J, Boyall J y Rogers P. (1999). The role of flagellated and ciliated protozoa in lagoon and grass filter sewage treatment systems. *Wat. Res.* 33(13): 2971-2977.

Lee S, Basu S, Tyles C y Wie I. (2004). Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island treatment Plant. *Adv. Environ. Res.* 8:371-378.

Lee J, Leedale G, Bradbury P. (2000). An illustrated guide referred to as protozoa, or newly discovered groups. Allen Press Inc. *Society of Protozoologists*. 1:1-689.

López-Ochoterena E y Serrano-Limón G. (1997). *Manual de técnicas protozoológicas*. Sociedad mexicana de historia natural. 272 pp.

Luna-Pabello V, Aladro M y Durán C. (1994). Efecto del substrato sobre las poblaciones de ciliados en un reactor de biodiscos. Caso Tipo: Nejayote, vinazas y aguas blancas de papel. *Serie Química ambiental*. Volumen 3. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 227 pp.

Luna-Pabello V, Plisson-Saune S, Paul E y Duran de Bazúa C. (1996). Ciliatological Characterization of a biological reactor that eliminates nitrogen with intermittent aeration. *Revista Lat-Amer Microbiol.* 38:89-96.

Lukkari T, Aatsinki M, Väisänen A y Haimi J. (2005). Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. *Appl Soil Ecol.* (en prensa).

Mackinnon L y Hawes R. (1961). *An introduction to the study of protozoa.* Oxford University Press. Great Britain. 425 pp.

Madoni P. (2000). The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. *Environ. Pollut.* 109:53-59.

Madoni P, Davoli D y Gorbi G. (1994). Acute toxicity of lead, chromium, and other heavy metals to ciliates from activated sludge plants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53:420-425.

Madoni P, Esteban G y Gorbi G. (1992). Acute Toxicity of Cadmium, Copper, Mercury, and Zinc to ciliates from Activated Sludge Plants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49:900-905.

Madoni P, Davoli D, Gorbi G, y Vescovi L. (1996). Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. *Water. Res.* 30(1) 135-141.

Maffucci F, Caurant F, Bustamante P y Bentivegna F. (2005). Trace element accumulation and tissue distribution in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the Western Mediterranean Sea (southern Italy). *Chemosphere* 58: 535-542.

Mantis I, Voutusa D y Samara C. (2005). Assessment of the environmental hazard from municipal and industrial wastewater treatment sludge by employing chemical and biological methods. *Ecotox Environ Safe.* (en prensa).

Manzl C, Ebner H, Köck G, Dallinger R y Krumschnabel G. (2003). Copper, but not cadmium, is acutely toxic for trout hepatocytes: short-term effects on energetics and ion homeostasis. *Toxicol. Appl. Pharm.* 191:235-244.

Margulis L, Corliss O, Melkonian M y Chapman J. (1990). *Handbook of Protozoa*. Ed Jones and Bartlett Publishers. USA. 914 pp.

Martín-González A, Borniquel S, Díaz S, Ortega R y Gutiérrez J. (2005a). Ultrastructural alterations in ciliated protozoa under heavy metal exposure. *Cell Biol. Int.* 29:119-126.

Martín-González A, Díaz S, Borniquel S, Gallego A y Gutiérrez J. (2005b). Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. *Res. Microbiol.* (en prensa).

Martins R, Pardo R y Boaventura A. (2004). Cadmium (II) and Zinc (II) adsorption by the aquatic moss *Foninalis antipyretica*: effect of temperature, pH and water hardness. *Water Res.* 38:693-699.

Miyoshi N, Kawano T, Tanaka M, Kadono T, Kosaka T, Kunimoto M, Takahashi T y Hosoya H. (2003). Use of *Paramecium* species in bioassays for environmental risk management: Determination of IC₅₀ values for water pollutants. *J. Health Sci.* 49(6):429-435.

Nalecz-Jawecki G. y Sawicki J. (1999). Spirotox-a new tool for testing the toxicity of volatile compounds. *Chemosphere.* 38(14): 3211-3218.

Nalecz-Jawecki G. y Sawicki J. (2002). The toxicity of tri-substituted benzenes to the protozoan ciliate *Spirostomum ambiguum*. *Chemosphere.* 46: 333-337.

Nalecz-Jawecki G. y Sawicki J.(2003). Influence of pH on the toxicity of nitrophenols to Microtox and Spirotox test. Chemosphere. 52:249-252.

Nicolau A, Mota M y Lima N. (1999). Physiological responses of *Tetrahymena pyriformis* to copper, zinc, cycloheximide and triton x-100. FEMS Microbiol. Ecol. 30:209-216.

Nicolau A, Dias N, Mota M y Lima N. (2001). Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment. Res. Microbiol.152:621-630.

Nikon M. (2002). Microscopy.

<http://www.microscopyu.com/moviegallery/pondscum/protozoa/spirostomum/28k/spirostomum02.html>. Fecha de consulta:11/11/2004

NMX-AA-087-1995-SCFI. Norma Mexicana. Análisis de agua- Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna* (Crustacea-Cladocera)-Método de prueba. Dirección General de Normas.

Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, Que establece los limites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. 06-01-97. Secretaría de Medio Ambiente. Recursos Naturales y Pesca.

Park S y Jang Y. (2003). Preparation and characterization of activated carbon fibers supported with silver metal for antibacterial behavior. J. Colloid Interface Sci. 261:238-243.

Patterson D. (1992). Free-living freshwater protozoa a color guide. Ed. Wolfe Publishing. England. 223 pp.

Pedahzur R, Shuval H y Ulitzur S. (1997). Silver and hydrogen peroxide as potential drinking water disinfectants: their bactericidal effects and possible modes of action. Water. Sci. Technol. 35:87-93.

Pelkonen K, Heinonen-Tanski H y Hännien O. (2003). Accumulation of silver from drinking water into cerebellum and musculus soleus in mice. *Toxicology* 186:151-157.

Puig A. (2004). Enciclopedia Ambiental.

<http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Bioindic.htm>

Ramoino P, Fronte P, Beltrame F, Diaspro A, Fato M, Raiteri L, Stigliani S y Usai C. (2003). Swimming behavior regulation by GABA_B receptors in *Paramecium*. *Exp Cell Res.* 291:398-405.

Salvadó H, Gracia M y Amigó M. (1995). Capability of ciliated protozoa as indicators of effluent quality in activated sludge plants. *Water. Res.* 29 (4) : 1041-1050.

Santore R, Di Toro D, Paquin P, Allen H y Meyer J. (2001). Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2 . Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*. *Environ Toxicol Chem.* 20 (10) : 2397-2402.

Sekkat N, Le Dú A, Jouany M y Guerbet M. (1992). Study of the interactions between Koper, cadmium and Ferbam using the protozoan *Colpidium campylum* Biossay. *Toxicol. Environ Saf.* 24:294-300.

Seth R, Yang S. Choi S. Sabean M y Roberts E. (2004). In vitro assessment of copper-induced toxicity in the human hepatoma line, Hep G2. *Toxicol. In Vitro.* 18:501-509.

Shin H, Park K, Lee B, Moon C y Lee M. (2003). Identification of genes that are induced after cadmium exposure by suppression subtractive hybridization. *Toxicology* 191:121-131.

Shiny K, Remani K, Nirmala E, Jalaja T y Sasidharan V. (2005). Biotreatment of wastewater using aquatic invertebrates, *Daphnia magna* and *Paramecium caudatum*. *Bioresource Technol.*96:55-58.

Silva-Neto I. (2000). Improvement of silver impregnation technique (Protargol) to obtain morphological features of protists ciliates, flagellates and opalينات. Rev. Brasil. Biol., 60(3) 457-459.

Silva Reyes C. (2003). Evaluación comparativa de la eficiencia de eliminación de *Escherichia coli* empleando hipoclorito de sodio, plata coloidal y *Paramecium caudatum*. Tesis profesional de QFB. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. 77 pp.

Sleigh M. (1989). Protozoa and other protists. Cambridge University Press. 342 pp.

Small E y Lynn D. (1985). Phylum Ciliophora Doflein, 1901 En: Lee J. Hutner S y Bovee E. An illustrated guide to the protozoa. Society of Protozoologists. Lawrence, Kansas. 393-575.

Squibb K. (2004). Applied Toxicology. Metals.

[Http://aquaticpath.umd.edu/appliedtox/metals+cd.pdf](http://aquaticpath.umd.edu/appliedtox/metals+cd.pdf). Fecha de consulta:28/03/05.

Takiguchi N, Tajima T, Asayama K, Ikeda T, Kuroda A, Kato J y Ohtake H. (2002). Behavioral Responses of the ciliated protozoan *Paramecium caudatum* to 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid and its analogues. J.Biosci. Bioeng. 93(4):416-420.

Tani T, Tominaga T, Allen R y Naitoh Y. (2002). Development of periodic tension in the contractile vacuole complex membrane of *Paramecium* governs its membrane dynamics. Cell Biol Int. 26(10): 853-860.

Twagilimana L, Bohatier J, Groliere CA, Bonnemoy F y Sargos D. (1998). A new low-cost microbiotest with the protozoan *Spirostomum teres*: culture conditions and assessment of sensitivity of the ciliate to 14 pure chemicals. Ecotoxicol. Environ. Saf. 41:231-244.

Utgikar V, Chaudhary N, Koeniger A, Tabak H, Haines J y Govind R. (2004). Toxicity of metals and metal mixtures: analysis of concentration and time dependence for zinc and copper. *Water Res.* 38:3651-3658.

Wang J, Huang C y Pirestani D. (2003). Interactions of silver with wastewater constituents. *Water Res.* 37:4444-4452

Wagtendonk Van W. (1974). *Paramecium A current Survey*. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam. 499 pp.

Yang X, Peng H y Tian S. (2005). Gama- aminobutyric acid accumulation in *Elsholtzia splendens* in response to Koper toxicity. *J Zhejiang Univ SCI.* 6B(2)96-99.

13. ANEXOS

ANEXO A

EFFECTO TÓXICO DE Cu, Cd, Zn Y Ag EN SERES HUMANOS

Aspectos generales de Cu

El Cu es un elemento esencial, debido a que forma parte integral de enzimas importantes que están involucradas en procesos biológicos requeridos para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento del organismo (Gaetke y Kuang, 2003). Este elemento traza esencial se encuentra en pequeñas cantidades tanto en células como en tejidos y en mayor cantidad en el hígado. La deficiencia de este elemento puede producir anemia, defectos en el esqueleto, degeneración en el sistema nervioso y fallas reproductivas (Goldhaber, 2003). Afectar las fibras del tejido vascular (Friberg *et al.*, 1990). La ingestión del Cu varía dependiendo del alimento, ya que es la mayor fuente de consumo para los animales. El agua natural, tiene una concentración media de 4-10 µg Cu/L El agua para beber representa aproximadamente entre 6 y 13% del promedio diario de ingestión de Cu. La EPA establece que el nivel máximo contaminante del cobre en agua para beber es de 1.3 mg Cu/L (Gaetke y Kuang, 2003). Sin embargo, puede resultar tóxico a concentraciones mayores de las requeridas, valor que varía de acuerdo al tipo de organismo, edad, alimentación, entre otros (Santore *et al.*, 2001).

Toxicidad:

El exceso de iones de Cu, induce la generación de radicales libres y estrés oxidativo en las células, inactiva enzimas, disminuye la permeabilidad de la membrana, porque se une a grupos sulfidrilos de las enzimas y proteínas membranales citoplásmicas, destruyendo la homeostasis metabólica (Yang *et al.*, 2005)

La exposición crónica afecta el hígado, manifestándose en cirrosis con episodios de hemólisis y daño en túbulos renales, cerebro y otros órganos, pudiendo agravarse hasta producir coma, necrosis hepática, colapso vascular y muerte (Gaetke y Kuang, 2003). Este tipo de exposición se ha presentado en trabajadores que emplean pesticidas que contienen Cu.

A niveles altos el cobre puede causar toxicidad aguda. La muerte de humanos puede ocurrir debido a ingestión deliberada de grandes cantidades. En general una dosis oral alrededor de

200 mg/kg al día se considera fatal en humanos (Goldhaber, 2003). Sin embargo a concentraciones menores a esta, como en el caso de exposición a humos industriales puede causar irritación aguda en el tracto respiratorio con flujo nasal, cuando se presenta exposición crónica, provoca daños en los pulmones como cáncer pulmonar y tuberculosis. En el caso de ingestión en altas dosis, mediante agua y alimentos contaminados, puede provocar perturbaciones agudas gastrointestinales: vómito, úlceras epigástricas y diarrea. Además de debilidad y letargo (Gaetke y Kuang, 2003; Friberg *et al.*, 1990). Mediante contacto cutáneo puede provocar dermatitis.

Una vez que el Cu es absorbido mediante ingestión, se une a los aminoácidos del torrente sanguíneo y por lo tanto a los tejidos muy rápidamente. Transportándose al hígado principalmente y en menor grado a médula ósea y otros tejidos. Almacenándose en hígado, cerebro, corazón, riñones y músculos (Friberg *et al.*, 1990).

A nivel molecular el exceso de cobre afecta el metabolismo de la glucosa dentro de los hepatocitos, y perturba la función de canales de calcio en la membrana plasmática (Manzl, 2003), daña la fluidez y permeabilidad de esta (Gaetke y Kuang, 2003). Provoca perturbaciones en mitocondria que puede ser consecuencia de daño lisosomal en el que se pierde la integridad y provoca la apoptosis (Seth *et al.*, 2004.). El almacenamiento excesivo de este metal, ocurre cuando se presenta la enfermedad de Wilson, que es una enfermedad autosomal recesiva hepática caracterizada por la deficiencia de la proteína ceruloplasmina. Los individuos con esta enfermedad no pueden metabolizar y eliminar adecuadamente el cobre, provocando su acumulación dentro del hepatocito, lo que daña los mecanismos del transporte del Cu acumulándose progresivamente en cerebro, riñones e hígado. Además de provocar dolor abdominal, náuseas, diarrea (Goldhaber, 2003; Seth *et al.*, 2004).

La principal forma de excreción es mediante la bilis y en menor cantidad puede ser excretado por medio del sudor. La eliminación vía orina, es mínima en animales y en humanos (Gaetke y Kuang, 2003).

La concentración normal de Cu en la sangre de humanos es de aproximadamente de 6 mg, el hígado normal de un adulto contiene de 148 a 45 µg Cu/g de peso seco (Gaetke y Kuang 2003).

La Organización Mundial de la Salud ha estimado que el requerimiento mínimo de cobre es de 0.6 mg/día para mujeres y de 0.7mg/día para hombres (Gaetke y Kuang, 2003).

Aspectos generales de Cd

El Cd es un contaminante ambiental ubicuo, nutricionalmente no es esencial, es tóxico ya que interactúa con 3 metales esenciales: Ca, Zn y Fe. La principal ruta de ingestión para el hombre, es a través del alimento, particularmente vegetales, granos y cereales (Goyer, 1997) y en los últimos años se ha incrementado su concentración en ambientes acuáticos. Se encuentra en la corteza terrestre, por actividades volcánicas y erosión (Kakkar y Jaffery, 2005). En aguas naturales el Cd se encuentra principalmente en sedimentos del fondo y en partículas suspendidas, en aguas naturales no contaminadas su concentración es usualmente menor de 1 µg/L. El agua para beber no debe exceder los 5 µg/L, y el uso de lodos residuales que contengan Cd, como fertilizante puede contaminar el suelo.

El Cd existe en ecosistemas naturales y puede ser movilizado por numerosas actividades incluyendo la minería (Larison *et al.*, 2000) Este contaminante de origen principalmente industrial fue el causante del fenómeno Itai-Itai (Fernández-Leborans y Novillo, 1995), que ocurrió a lo largo del río Jinzu en Japón cerca de una mina, lo que provocó muchos casos de dicha enfermedad (Ishihara *et al.*, 2001) durante y después de la segunda guerra mundial (Ishihara *et al.*, 2001), ya que el agua de este río era empleada para el riego de arroz y consumo, provocando la exposición crónica de los pobladores de dicha región, causando deficiencia de Ca, vitamina D, Zn y Fe.

Toxicidad

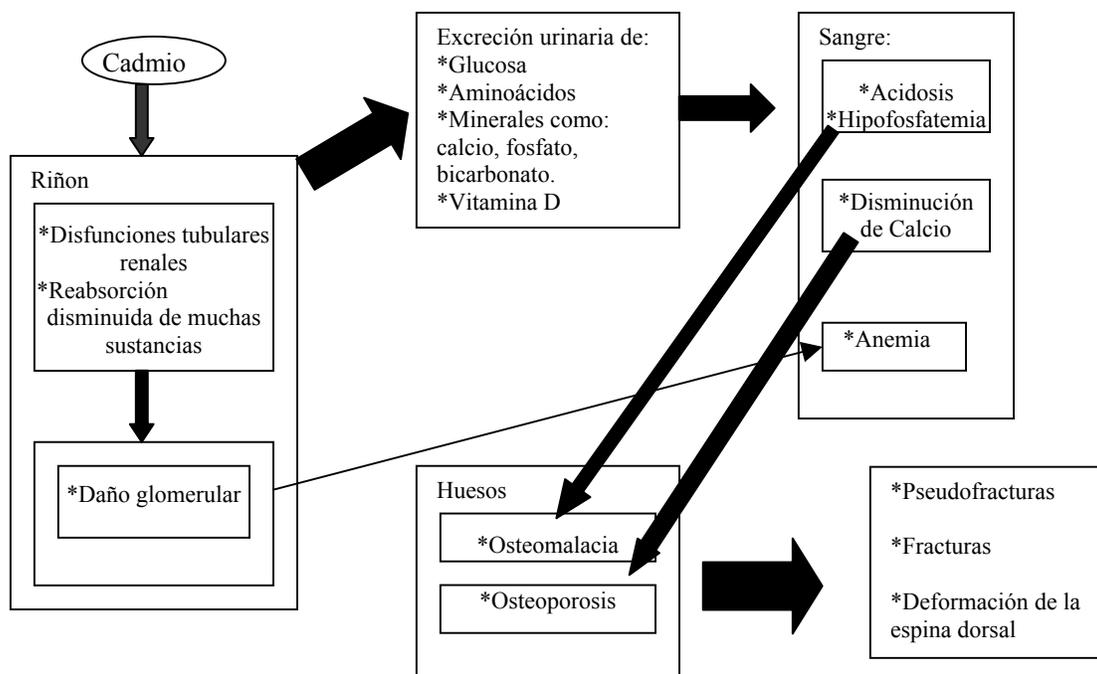
La toxicidad involucra 2 sistemas principalmente: el sistema renal y esquelético.

La exposición oral, puede ocurrir a través de alimento o agua contaminada, cigarrillos. Después de la absorción de los pulmones o del intestino, el Cd es transportado mediante la sangre a otras partes del cuerpo (Friberg *et al.*, 1990; Damek-Poprawa y Sawicka-Kapusta, 2003). La concentración de Cd en los tejidos incrementa con la edad, ya que disminuye la excreción, la que es mediante heces y orina (Friberg *et al.*, 1990; Goyer 1997).

La exposición aguda a Cd mediante inhalación puede causar síntomas de neumonitis y edema pulmonar, debilitamiento, fiebre, insuficiencia respiratoria y muerte. Mediante ingestión causa náuseas, vómito, dolor abdominal, diarrea (Friberg *et al.*, 1990).

En la enfermedad japonesa Itai-Itai provocada por exposición crónica a Cd, mediante la ingestión de arroz y agua contaminada, involucra mucho dolor de huesos, fracturas espontáneas y lesiones renales (Ishihara *et al.*, 2001) ya que se combinan daños renales con osteomalacia y varios grados de osteoporosis debido al consumo de agua y alimentos contaminados (Friberg *et al.*, 1990). Dicha enfermedad ataca principalmente a mujeres provocando dolor en el área lumbar, hombros, extremidades y posteriormente en todo el cuerpo, causando perturbaciones al caminar, dificultando el movimiento, además de las fracturas, el paciente gradualmente pierde peso y muere (Kasuya, 2000). Los desordenes renales ocurren primero, después de la exposición crónica al Cd, seguido por el desarrollo de osteomalacia. La característica típica de intoxicación con Cd es el daño al riñón, ya que afecta las funciones de reabsorción de los túbulos proximales provocando excreción renal excesiva de glucosa, aminoácidos minerales (como Ca y Na), proteínas (Friberg *et al.*, 1990; Kasuya, 2000; Damek-Poprawa y Sawicka-Kapusta, 2003) y el metabolismo de la vitamina D (Goyer, 1997). Otra de las características de esta enfermedad es que se produce anemia severa, hipofosfatemia, debido a la excesiva excreción renal de fosfato, lo que provoca la osteomalacia. Los síntomas de la osteomalacia son pseudofracturas, fracturas, deformación de la espina dorsal y dolor de huesos.

Este metal y sus compuestos son clasificados por IARC (International Agency for Research on Cancer) como grupo I de carcinógenos para humanos. El Cd tiene un periodo de vida media para el humano de 25-30 años (Kakkar y Jaffery, 2005; Shin *et al.*, 2003).



Mecanismo de la enfermedad Itai-Itai (tomado de Kasuya,2000)

Aspectos generales de Zn

El Zn es un componente de una amplia cantidad de enzimas y es parte integral de DNA polimerasa (Friberg *et al.*, 1990; Goldhaber, 2003).

La deficiencia de este elemento, decrece la producción de DNA y RNA, lo que reduce la síntesis de proteínas, los signos de deficiencia de Zn en humanos incluye pérdida de apetito, retardo en el crecimiento, cambios en la piel, anemia y durante la gestación se producen desordenes en la descendencia (Goldhaber, 2003).El Zn también interfiere con el metabolismo de lípidos y de carbohidratos (Friberg *et al.*, 1990).

El Zn es principalmente eliminado mediante heces, y en menor cantidad en la orina. Altos niveles son encontrados en hueso, músculo, riñón y páncreas.

El agua marina y dulce, presenta una concentración alrededor de 1-10µg/L (Friberg *et al.*, 1990).

Toxicidad

La exposición a grandes cantidades de Zn mediante inhalación, puede resultar en efectos severos del tracto respiratorio, con neumonitis y edema pulmonar.

Reportes de efectos tóxicos debido a ingestión son pocos comunes, el Zn es parcialmente no tóxico, sin embargo, se ha reportado alimento contaminado, por contenedores galvanizados con Zn los síntomas han sido: náuseas, vómito, diarrea y cólicos (Friberg *et al.*, 1990). Provoca irritación gastrointestinal y vómito, al ingerir 2 g o más (Goldhaber, 2003).

Aspectos generales de Ag

Se encuentra en la naturaleza como metal libre o combinado con diversos minerales, principalmente con sulfuros, de los cuales la Ag se extrae por medio de la fundición con Pb. Las principales fuentes antropogénicas de Ag en el ambiente son de los desechos provenientes de la industria fotográfica, de la minería, del electroplateado, de la manufactura de aparatos electrónicos, del labrado de la Ag y de la joyería. Se ha estimado que 150,000 kg de Ag se deposita en ambientes acuáticos, debido a estas actividades (Wang *et al.*, 2003). Desde la antigüedad se ha empleado como desinfectante (Park y Jang, 2003), esto se remonta a miles de años atrás; los persas, aztecas, griegos y romanos observaron que al poner diversos líquidos en vasijas de plata se mantenían sin descomposición por más tiempo.

En la actualidad se sabe que puede inactivar bacterias, hongos, levaduras, virus, protozoarios y algas. Entre los compuestos de plata utilizados como antisépticos se encuentran el nitrato de plata (AgNO_3) y la plata iónica. El AgNO_3 es bactericida para la mayoría de los microorganismos, y se utiliza en la desinfección de agua para consumo humano, en particular se sabe que se emplea en barcos para potabilizar agua (Friberg *et al.*, 1990). La exposición a altos niveles produce la argiria (coloración grisácea de la piel y de las mucosas, es rara e irreversible).

La Organización Mundial de la Salud (WHO) recomienda que la concentración de iones de Ag en el agua potable no exceda 0.10 mg/L, pero la EPA recomienda como máximo 0.05mg/L (Pelkonen *et al.*, 2003).

La principal forma excreción es mediante heces, seguida por bilis (Friberg *et al.*, 1990).

Toxicidad

La Ag es considerada tóxica para los humanos y la Organización Mundial de la Salud (WHO) recomienda como concentración máxima 0.1mg/L de iones en la desinfección de agua para beber, pero la EPA recomienda como máximo 0.05 mg/L.

AgNO₃ es absorbido a través de los pulmones y membranas mucosas y posteriormente es transportado a la sangre y se une a las globulinas.

La toxicidad sistémica no está bien documentada, cuando sus compuestos se usan en heridas.

Se ha sugerido que el blanco molecular, reside en los grupos celulares SH-, los cuales son muy importantes en la actividad de enzimas y en estructuras proteínicas. Se ha reportado que inhibe el proceso de deshidrogenación, promueve el flujo de fosfato, K⁺ y otros sustratos. A nivel celular puede causar anomalías en: tamaño, contenido citoplásmico y membrana celular. (Pedahzur *et al.*, 1997). En cerdos, produce necrosis cardíaca.

Debido a los efectos microbicidas, afecta a la microbiota intestinal, provocando desordenes gastrointestinales (Pelkonene *et al.*, 2003).

Los efectos tóxicos agudos se producen principalmente en el sistema cardiovascular, en hígado y en sistema hematopoyético. Se puede producir necrosis hepática, alteración ultraestructural de la mitocondria y lisosomas en animales.

En autopsias realizadas en humanos debido a ingestión de plata se observa edema pulmonar, hemorragia y necrosis de médula ósea, hígado y riñón.

Los efectos crónicos debido a la exposición a las sales por inhalación o ingestión puede producir una condición llamada argíria, que es un decoloramiento azul-grisáceo de la piel y otros tejidos que se incrementa en las áreas con mayor exposición a la luz solar. Las exposiciones a niveles menores, se acumulan la piel y en otras partes del cuerpo (Friberg *et al.*, 1990). Un estudio en ratones demostró que los animales expuestos a plata en el agua para beber eran menos activos que los animales que no eran expuestos. No hay estudios disponibles acerca de efectos de la plata sobre la reproducción o el desarrollo en seres humanos (Friberg *et al.*, 1990; Pelkonen *et al.*, 2003).

La plata en humanos se acumula en: piel, hígado, cerebro, ovario y traquea, y en algunas ocasiones se ha observado que se puede transmitir mediante la leche materna.

ANEXO B

MEDIOS DE CULTIVO

Medio de cultivo para *S. intermedium*.

Cebada 1g

1. Hervir el material en 500ml de agua de la llave durante 20 min
2. Dejar enfriar a 28 °C aproximadamente
3. Inocular con la muestra de protozoos

Medio de cultivo para *P. caudatum*

Hoja de lechuga 2g

1. Picar finamente la hoja de lechuga y hervir durante 40 min en 500 ml de agua de la llave.
2. Dejar enfriar a 28°C aproximadamente
3. Inocular con la muestra de protozoos

Técnicas de tinción**Hematoxilina de Harris**

Reactivos:

Agua acidulada 2%

 Agua destilada 19.6ml

 Ac. Clorhídrico 0.4ml

Agua corriente

Agua destilada

Alcohol etílico 30%, 50%, 70%,96% y 100%

Hematoxilina de Harris (Sigma)

Es necesario filtrar el colorante para evitar que queden cristales que alteran mucho la calidad de las preparaciones

Xilol

Bálsamo de Canadá

Procedimiento:

- 1) Concentrar los protozoos: centrifugar el cultivo o la muestra durante 2 min a 500 rpm. Decantar el sobrenadante
- 2) Colocar con una pipeta 1-2 gotas del concentrado sobre un portaobjetos. Para tratar de adherir a los organismos en el portaobjetos, dejar evaporar durante 5-10min
- 3) Agregar unas gotas del colorante (la cantidad suficiente para cubrir a los organismos concentrados) de 3 a 5 min. Observar la intensidad de la coloración bajo el microscopio. Si se observa sobreteñida, lavar con unas gotas de agua acidulada
- 4) Escurrir
- 5) Virar con unas gotas de agua corriente
- 6) Escurrir
- 7) Lavar con unas gotas de agua destilada
- 8) Escurrir
- 9) Deshidratar con alcoholes graduales de 30%, 50%, 70%, 96% durante 5 min en c/u, y en 100% 10 min (dos cambios de 5 min c/u). Escurrir en cada cambio
- 10) Aclarar con xilol durante 5 min
- 11) Montar en bálsamo de Canadá

Tinción NMF . Nigrosina Hg-Cl₂-formol (NMF) de Borrer

Reactivos:

Alcohol etílico 70%, 96% y 100%

Cloruro de magnesio 8%

Fijador colorante:

Concentración final: 12 partes de solución Nissenbaum y una parte de solución Deroux-Fady. Esta mezcla se prepara en el momento que se va a utilizar.

Solución Nissenbaum:

Solución acuosa saturada de bicloruro de mercurio 10ml

Ácido acético glacial 2ml

T-butanol 10ml

Formol comercial 2ml

Mezclar y conservar la solución en un frasco oscuro

Solución Deroux-Faidy

Formol comercial 40ml

Nigrosina 4g

Agua destilada 100ml

Mezclar y conservar la solución en un frasco oscuro

Xilol

Bálsamo de Canadá

Procedimiento:

- 1) Concentrar los protozoos: centrifugar el cultivo o la muestra durante 2 min a 500 rpm. Decantar el sobrenadante
- 2) Colocar con una pipeta 1-2 gotas del concentrado sobre un portaobjetos. Para tratar de adherir a los organismos en el portaobjetos, dejar evaporar durante 5-10min
- 3) Añadir 2-3 gotas del fijador-colorante a una altura de 2-3 cm

- 4) Después de unos segundos, agregar varias gotas del fijador-colorante en uno de los extremos del portaobjetos dejando que corra al centro del portaobjetos, después de 15-25 s escurrir el exceso
- 5) Deshidratar en alcoholes 70%,96% y 100% de 3-5 min c/u
- 6) Aclarar con xilol (2 cambios 5 min c/u)
- 7) Montar en bálsamo de Canadá

Técnica de Klein

Reactivos:

Nitrato de plata al 5%

Nitrato de plata 5g

Agua destilada 100ml

Procedimiento:

- 1) Colocar una gota de muestra con abundantes ciliado sobre un porta-objetos, extender y dejar secar al aire
- 2) Agregar gotas de nitrato de plata al 5%, las necesarias para cubrir a los organismos
- 3) Colocar el portaobjetos bajo una lámpara de rayos ultravioleta durante 5 min o a los rayos del sol durante 10 min
- 4) Lavar con gotas de agua de la llave
- 5) Dejar secar al aire
- 6) Montar con bálsamo de Canadá

Técnica modificación de protargol (Silva-Neto, 2000).

- 1) Concentrar los ciliados
- 2) Quitar el exceso de agua
- 3) Fijar con Bouin 20 min

Lavar 3 veces con agua destilada, agregar en los últimos lavados 2-3 gotas de hipoclorito de sodio al 3%.

Mezclar e incubar por 30 seg.

Los ciliados se colocan en un portaobjetos y se agrega una pequeña gota de albumina-glicerol diluida con agua destilada (1:2:1).

El material se distribuye homogéneamente y se deja secar a temperatura 40-50°C

Antes de la impregnación cubrir la preparación con una mezcla alcohol-formol (8:2)

Dejar 1 min y lavar 2 min. Dejar secar al aire

Usar una charola de vidrio rectangular con una tapa y en el fondo poner papel filtro húmedo

Se distribuyen las preparaciones secas en una charola y con una pipeta se cubren con protargol al 0.8%-4%

La charola se pone en la incubadora a 45°C-50°C 30 a 60 min dependiendo del tamaño de los protozoos.

Lavar las preparaciones una a una rápidamente con agua destilada.

Pasar a hidroquinona 0.4% durante 10-20 seg

Pasar a tiosulfato 2.5% durante 30 seg

Lavar con agua destilada 1min

Deshidratar en serie de alcoholes del 50 al 100%, 3 min c/u y en 100% 5 min en 2 ocasiones

Poner en xilol 10 min

Montar con bálsamo de Canadá.