

42
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

EVALUACION DEL EFECTO TOXICO DEL NIQUEL
EN SEDIMENTOS ARTIFICIALES SOBRE
Moina macrocopa.

T E S I S

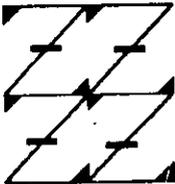
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

AUDELIA MONTERO SANTIAGO

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN

MEXICO, D. F.

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

267688



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se desarrolló en el
Laboratorio de Toxicología Acuática, del departamento de
Farmacia en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del
Instituto Politécnico Nacional.

Sustentante: Audelia Montero Santiago

Director : Dra. Laura Martínez Tabche

Asesor : Q.F.I. Estela Valencia Plata

Gracias a dios por darme la vida y fortaleza para seguir adelante y vencer todas las adversidades que he pasado para culminar esta meta. Gracias por iluminar mi camino.

Dedicatorias

A mi familia porque unidos saldremos siempre adelante

A mi padre, Aauto Montero, quien me ha enseñado el valor de la vida, brindándome; confianza, cariño, respeto, ayuda y brillante ejemplo de trabajo y superación, que han iluminado siempre el sendero de mi existir.

A mi madre, Felicidad Santiago, quien ha luchado con valor sacrificio y amor por sus hijos, dándome su apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida, confianza, cariño y por ser mi mejor amiga.

A ustedes debo y dedico este trabajo.

A mis hermanos: Herminia, Leticia, Beto, Liliana, Fernando, Yerisa y Daniel.

Por ayudarme cuando los he necesitado, por soportar mi mal genio, por su profundo interés, porque compartimos la vida, el tiempo, felicidad, sueños, siempre juntos.

Espero que este trabajo les sirva de estímulo para continuar superándose en sus vidas, y que pronto puedan ver sus metas realizadas

A mi sobrino Yael. Por darme alegría. Espero que tu futuro sea brillante, que la vida te depare dicha y triunfo.

Con estimación a la familia Montero Parra

A mis tíos Joel Montero y Consuelo Parra

A mis primos porque son fuente de inagotables sonrisas e inocencia.

A todos mis familiares.

Por ser parte fundamental en mi vida y en mi desarrollo Gracias.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación como profesionista y persona.

Con cariño y respeto, para mis maestros y amigos.

Dra. Laura Martínez Tabche : Por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto.

Q.F.I Estela Valencia Plata : Agradezco su apoyo, tiempo brindado, y comentarios para asesorar el presente trabajo.

Q.F.I Velia Ulloa Sánchez : Mi agradecimiento por su amistad, consejos, orientación, apoyo que me han ayudado en mi formación profesional y personal, así como sugerencias y entusiasta colaboración en todo momento, haciendo posible la elaboración y culminación de éste trabajo.

Al jurado asignado:

Presidente: M. En C. Amada López García
Vocal: Q.F.I. Estela Valencia Plata
Secretario: M. En C. Lourdes A. Castillo Granada
Suplente: Q.F.I. Ma. del Carmen Niño de Rivera O.
Suplente: M. En C. Evangelina López Nieto

Expreso mi agradecimiento a los miembros del jurado que tan amablemente accedieron a la revisión de la tesis, indicándome mejoras y formas de clarificar los conceptos para la lectura del presente trabajo.

A mis amigos

A todos mis compañeros de generación y de la Fes Zaragoza, por su amistad.

Porque la prosperidad hace amistades y la adversidad las prueba.

A Sara por ser siempre mi amiga, con quien he compartido momentos alegres y tristes durante toda la carrera, pero sobre todo una gran amistad.

A Isis por todo lo que aprendimos juntas y porque la esperanza nunca muere aunque tus ojos en cierto momento no la logren ver.

A los compañeros del laboratorio de Toxicología Acuática, que han estado cerca de mi en su momento.

Deseo externar mi mas sincero reconocimiento a la profesora Velia Ulloa Sánchez, porque debo a su apoyo y amistad la realización de este trabajo.

Mi agradecimiento a cuantas personas han hecho posible la realización del presente trabajo.

A todos ustedes. Gracias.

El poder sobre mí mismo es mejor que mil años de poder sobre los demás.

Fudail Ibn Ayad

Cuanto más sería la enfermedad, más importante es para ti luchar, movilizándolo todos tus recursos, espirituales, emocionales, intelectuales y físicos.

Norman Cousins

Sube la montaña, vence sus obstáculos; la paz de la naturaleza fluirá en ti como el brillo del sol fluye en los árboles; los vientos lanzarán su propia frescura en ti, como las tormentas su energía, mientras que las preocupaciones se irán lejos de ti como las hojas de otoño.

Jonh Muir

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Índice de abreviaturas	i
Resumen	iii
I. Introducción	iv
II. Fundamentación del tema	1
II.1. Generalidades Níquel	1
II.1.2. Propiedades Físicas y Químicas	1
II.1.3. Fuentes y Usos	1
II.1.4. Níquel en Aire, Agua, Suelo y Alimentos	2
II.1.5. Poblaciones Expuestas	4
II.2. Toxicocinética del Níquel	4
II.2.1. Metabolismo	6
II.2.2. Mecanismo Tóxico del Níquel	7
II.2.3. Efectos Toxicológicos	7
II.3. Sedimentos	10
II.3.1. Componentes de un sedimento	10
II.3.2. Rutas de Exposición	12
II.3.3. Sedimentos Artificiales	12
II.3.4. Caracterización	13
II.4. Ensayos Biológicos	14
II.5. Indicadores Bioquímicos	14
II.5.1. Hemoglobina	15
II.5.2. Determinación In vitro de la Actividad de las Esterasas de <i>M. macrocopa</i> .	16
II.6. Espectrofotometría de Absorción Atómica	19
III. Planteamiento del Problema	22
IV. Objetivos	24

V. Hipótesis	26
VI. Material	27
VII. Metodología Experimental	31
VII.1. Método	31
VII.2. Preparación del Sedimento	31
VII.2.1. Caracterización Física y Química del Sedimento	32
VII.3. Preparación del Material Biológico	35
VII.4. Evaluación de la CL ₅₀ del Níquel	36
VII.5. Evaluación de la Toxicidad subletal del Níquel	37
VII.5.1. Determinación de Hemoglobina	37
VII.5.2. Evaluación de la Actividad de la Acetilcolinesterasa.	37
VII.5.3. Determinación de la Actividad de Acetilcolinesterasa de <i>M. macrocopa</i> .	38
VII.5.4. Determinación de Proteínas Totales	38
VII.6. Determinación de Níquel en Fase Acuosa	39
VII.6.1. Determinación de Níquel en Sedimento	39
VII.7. Diagrama de Flujo	40
VIII. Resultados	42
VIII.1. Composición del Sedimento Artificial	44
VIII.2. Características Físicas y Químicas del Sedimento	44
VIII.3. CL ₅₀ del Níquel en Agua y Sedimento	45
VIII.4. Gráficas de Toxicidad Aguda del Níquel	46
VIII.5. Tablas del Efecto Tóxico del Níquel sobre el Metabolismo de <i>M. macrocopa</i> .	47
VIII.6. Gráficas de los niveles de Proteínas, Hemoglobina y Actividad de Acetilcolinesterasa.	48
VIII.6.1. Comparación Intergrupo de los niveles de Proteínas y Hemoglobina.	51

VIII.7. Comparación Intergrupo del % de Estimulación e Inhibición de Proteínas, Hemoglobina y Acetilcolinesterasa.	52
VIII.8. Concentración del Níquel en Fase Acuosa y Sedimento a las 24 y 48 horas.	53
VIII.8.1. Concentración del Níquel en Fase Acuosa a las 24 y 48 horas.	54
VIII.8.2. Concentración de Níquel en Sedimento a las 24 y 48 horas.	54
VIII.9. Concentración de Níquel en Fase Acuosa y Sedimento a las 48 horas de Exposición a Concentraciones Subletales.	55
IX. Análisis de Resultados	56
X. Conclusiones	69
XI. Sugerencias	72
XII. Anexos	73
XII.1. Anexo 1. Glosario	73
XII.2. Anexo 2. Características Generales de <i>M. macrocopa</i>	76
XII.3. Anexo 3. Preparación de Curvas de Calibración	80
XII.4. Anexo 4. Análisis Estadístico	88
XII.4.1. Análisis de Varianza y Prueba de Tukey's de Proteínas Hemoglobina y Actividad de Acetilcolinesterasa.	90
XII.4.2. Análisis de Varianza y Prueba de Tukey's para Níquel en Sedimento y Fase Acuosa.	95
XII.5. Anexo 5. Límites Máximos Permisibles de Níquel en las Descargas de Aguas Residuales en aguas y Bienes Nacionales.	97
XIII. Bibliografía	98

Índice de Abreviaturas

Símbolo	Concepto
%C	por ciento de Carbono Orgánico
µg/L	microgramos por litro
µL	microlitro
µM	micromol
µm	micrómetro
µseg	microsegundo
° C	grados celsius
AAS	Espectrofotometría de Absorción Atómica
Ach	Acetilcolina
AchE o Achasa	Acetilcolinesterasa
C.O	Carbono Orgánico
cel/mL	Células por mililitro
CIC	Capacidad de Intercambio Catiónico
CL ₅₀	Concentración Letal Media
cm	Centímetro
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DL ₅₀	Dosis Letal Media
DVS	Diferencia Verdaderamente Significativa
EDTA	Sal Etilenodiaminotetracetato disódico
g	gramo
g.l	grados de libertad
GABA	Ácido γ- amino butírico
gph	gramos de peso húmedo
L	litro
Log	Logaritmo
M	molar
<i>M. macrocopa</i> o <i>Moina m.</i>	<i>Moina macrocopa</i>
M.C	Media de cuadrados
M.O	Materia Orgánica
mA	microamper
meq/100 g	miliequivalentes por cien gramos
mg	miligramo
mg/g	miligramos por gramo
mg/Kg	miligramos por kilogramo
mg/L	miligramos por litro
mgpr/min	miligramo de proteína por minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
N	normal
ng/m ³	nanogramos por metro cúbico

Ni	Níquel
nm	nanómetro
O.D	Oxígeno Disuelto
ppm	partes por millón
Pr	Proteínas
S.C	Suma de cuadrados
SE	Desviación Estándar
SNP	Sistema Nervioso Periférico

RESUMEN

El presente trabajo consistió en determinar la toxicidad del níquel. Los bioensayos se realizaron empleando sedimentos artificiales y con el organismo *Moina macrocopa*.

En la primera parte se preparó un sedimento artificial para sistemas de agua dulce y se realizó la caracterización física y química de este.

La segunda parte consistió en determinar la CL_{50} del níquel en agua y sedimento sobre la especie *Moina macrocopa*. Las CL_{50s} encontradas en un lapso de 48 horas fueron:

Para agua $CL_{50} = 6.84$ ppm y sedimento $CL_{50} = 12.09$ ppm de níquel. Encontrándose según la clasisificación de los tóxicos de acuerdo a su grado de toxicidad (SARH, 1980), que el producto es tóxico, ya que las CL_{50s} se encuentran entre 6 y 12 ppm.

La tercera parte consistió en exponer al organismo a concentraciones subletales del metal mediante bioensayos con sedimentos, obteniendo aumento y disminución en la concentración de proteínas, hemoglobina y actividad de la acetilcolinesterasa en el cladóceros, siendo estos valores significativos y constantes en las concentraciones respectivas de níquel utilizadas.

La cuarta parte consistió en determinar níquel en fase acuosa y sedimento por Absorción Atómica. Encontrando que la mayor parte del metal 94.69% tiende a acumularse en el sedimento y solo el 3.77% se encuentra en la fase acuosa.

En este trabajo se encontró que el níquel esta biodisponible para el organismo *Moina macrocopa*, ya que se observaron efectos tóxicos a las concentraciones empleadas.

I. INTRODUCCIÓN

Aunque desde la antigüedad se ha descrito acerca de los daños ecológicos producidos por el continuo incremento de la contaminación por tóxicos en ambientes acuáticos, hasta estos últimos años, este problema ha sido motivo de gran preocupación en nuestro país, debido a que el acelerado crecimiento urbano e industrial ha aumentado la complejidad de los residuos que se descargan al ambiente, provocado serios problemas toxicológicos y de impacto ambiental, en las comunidades expuestas a estas descargas.

Los metales pesados han sido identificados como uno de los más peligrosos contaminantes de los sistemas acuáticos, debido a su persistencia y gran toxicidad para muchos organismos. Ellos pueden estar presentes en agua y sedimento. Los estudios relacionados con la presencia y efectos de estos sobre la vida, son de suma importancia en la preservación del equilibrio ecológico, y así como en la protección de la salud humana, si se considera la posibilidad de los fenómenos de bioacumulación y persistencia de los metales a través de cadenas alimenticias o al uso del agua para consumo humano, recreación e irrigación, y si el último eslabón es el hombre, entonces el problema es aún más grave, ya que la concentración final va a ser mayor que la concentración del primer eslabón de la cadena.

Hasta hace unos años la preocupación en materia ambiental en países industriales ha originado estudios sobre la relación que guardan elementos pesados como: Arsenico (As), Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Mercurio (Hg), Níquel (Ni) y Plomo (Pb) los cuales pueden afectar la función de cualquier ser vivo. Muchos son los metales pesados que comúnmente, contribuyen al deterioro ambiental y también muchas son las formas de vida que se ven afectadas por la presencia de estos contaminantes. considerando lo anterior y dada la importancia de realizar trabajos que se enfoquen a este tipo de

problemática y con el fin de inferir posibles soluciones que aminoren o eliminen los efectos nocivos de los diferentes contaminantes se realizó este trabajo con níquel como tentaviva para visualizar los efectos toxicológicos de este metal debido a que el uso de materiales que lo contienen, ha estado incrementándose en los últimos años, es probable que la concentración de este metal en suelo, sedimento, aguas superficiales y en atmósfera continuará aumentando en la misma medida.

En México, se realizan esfuerzos por incluir en la legislación, los aspectos toxicológicos y evaluaciones rutinarias de tóxicos; así como establecer metodologías que permitan una rápida, económica y eficaz determinación de efectos tóxicos de productos químicos; claramente todavía queda mucho por hacer, pero el cumplimiento de los objetivos planteados, en este trabajo pretende fortalecer las bases y principios fundamentales para determinar el efecto tóxico de elementos tales como el níquel el cual es ampliamente utilizado en la industria química.

Muchas sustancias químicas y sus productos de degradación son tóxicos, aún cuando se encuentran presentes a niveles de trazas y únicamente 20% pueden describirse como sustancias de las cuales se dispone información mínima sobre toxicidad. Se hace notar que no se tiene información disponible sobre salud del 75-80% de las sustancias químicas industriales.

Es importante también destacar que uno de los principales problemas que afronta el sector industrial mexicano, consiste en preservar el medio ambiente, evitar alteraciones ocasionadas por deshechos industriales y mantener el equilibrio de los ecosistemas hasta donde sea posible.

Es necesario determinar la toxicidad del níquel en organismos acuáticos como *Moina macrocopa* (pulga acuática), por ser una especie abundante e importante en diversas cadenas tróficas, sensible y buen indicador biológico de la

contaminación acuática y evitar así el peligro de la bioacumulación previniendo el daño a las especies que forman parte de la cadena alimenticia.

Por esta razón es tema de interés el estudio del efecto tóxico del níquel en sedimentos artificiales sobre *Moina macrocopa*. El cual sienta las bases para llevar a cabo bioensayos de toxicidad estandarizados, sencillos, rápidos y económicos con microorganismos que puedan encontrarse en cualquier ambiente y que además permitan cuantificar y evaluar de manera real y sensible los distintos grados de contaminación y los cambios en los distintos niveles tróficos.

II. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA

II.1. GENERALIDADES NÍQUEL

Antecedentes Históricos: Axel Frederik Cronstedt, un minerólogo suizo, identificó en 1751 un nuevo elemento metálico como un constituyente de un mineral común: "Kupfernickel". En el folklore alemán "Nickel" se refería a un pícaro, diablo o enano "(Old Nick)", por lo que, Kupfernickel significaba el "cobre de Old Nick", Cronstedt denominó "Nickel" al nuevo elemento y describió algunas de sus propiedades físicas y químicas (*Hausinger, P.R. 1993*).

II.1.2. Propiedades Físicas y Químicas

El níquel es un elemento metálico de color blanco, plateado, brillante, duro, dúctil, maleable y ferromagnético. Pertenece al grupo VIII B de la tabla periódica, con un número atómico de 28 y un peso atómico de 58.71. Comprende una mezcla de cinco isótopos naturales con pesos atómicos de 58, 60, 61, 62, y 64.

El punto de fusión del níquel metálico es de 1453 °C y el punto de ebullición es de 2732 °C siendo un buen conductor del calor y de la electricidad (*Scoot, JJ; Fordsmand. 1997*).

II.1.3. Fuentes y Usos

El níquel y sus compuestos pueden ser detectados ampliamente en el ambiente incluyendo plantas y animales utilizados para el consumo humano, en el aire, suelo, agua potable, ríos, lagos, océanos. Constituye cerca del 0.0086% de la corteza terrestre y se encuentra en una proporción de 75 mg/kg (rango :58-94 mg/kg), predominando en las rocas ígneas (*Duke. 1980*).

Desde el punto de vista comercial los minerales más importantes son: a) pentlandita y pirrotita minerales de sulfuro y b) el silicato de garnierita. Alrededor del 60% de todo el níquel que se produce se obtiene de la pentlandita (*E.P.A. 1986*).

Usos

El níquel es utilizado principalmente en la producción de aleaciones, incluyendo acero inoxidable, en la industria de maquinaria, industria química y electrónica, utensilios domésticos, acuñación, galvanoplastia (electroplastia), producción de pinturas, pigmentos y en la industria de cerámica. De igual modo se utiliza en las áreas nuclear y aeroespacial y como catalizador en procesos industriales y de refinación del petróleo. Alrededor de un 50% del níquel se utiliza en la producción de acero inoxidable y un 22% aproximadamente en otras aleaciones, correspondiendo cerca de un 12% a la galvanoplastia (García, M.M. 1992).

II.1.4. Níquel en: Aire, Agua, Suelo y Alimentos

Aire: Las principales fuentes primarias de emisión del níquel al aire ambiental son la combustión de los productos de petróleo (quema de carbón y aceite para la generación de energía o de calor); la industria primaria (minería, fundición y refinación), la incineración de desechos municipales; la industria intermedia (manufactura de acero, galvanoplastia); y la combustión de vehículos automotores. Otras fuentes son la manufactura de cemento, las minas de asbesto y las emisiones de fuentes menores, (volcanes) y la producción de aleaciones de níquel.

El níquel en el aire ha sido monitoreado en el mundo en diferentes regiones, urbanas y no urbanas. Los niveles de níquel en el aire ambiental se presentan en un rango de 10 a 60 ng/m³ en zonas urbanas y de 1 a 20 ng/m³ en zonas rurales.

Se han encontrado promedios de níquel en áreas muy industrializadas, con cifras mayores de 100 ng/m³.

Agua: Las fuentes posibles de níquel en agua y en suelos incluyen las aguas de inundaciones de riego, los suelos transformados con lodos de residuos municipales, las aguas residuales municipales e industriales sin previo tratamiento

(ver anexo 5), las aguas de plantas de tratamiento de residuos municipales, y las aguas subterráneas cerca de los terrenos utilizados para rellenos.

Los valores de 2-10 $\mu\text{g/L}$ en agua potable son bastante comunes. En estudios realizados en 969 sistemas públicos de abastecimiento de agua, en los Estados Unidos, durante 1969-1970 el nivel promedio de níquel fue de 4.8 $\mu\text{g/L}$, excediendo los 25 $\mu\text{g/L}$, solamente en 11 sistemas.

El níquel ha sido monitoreado en aguas superficiales, profundas, potables y en el sedimento. Las concentraciones de níquel en el agua de mar fluctúan entre 0.1 y 0.5 $\mu\text{g/L}$. La concentración típica promedio del níquel en el agua superficial está en el rango de 15 a 20 $\mu\text{g/L}$.

Suelo: La concentración de níquel en los suelos agrícolas fluctúa en un rango de 5 a 500 $\mu\text{g/g}$ con un nivel de 50 $\mu\text{g/g}$. En tierras no agrícolas el rango fluctúa entre 4 y 80 $\mu\text{g/g}$ con una mediana de 26 $\mu\text{g/g}$ en suelos cercanos a refinerías. El níquel puede ser introducido al suelo agrícola por la aplicación de sedimentos residuales.

Alimentos: Se han encontrado en varios tipos de alimentos; en granos, vegetales y frutas, de 0.02 a 2.7 $\mu\text{g/g}$; en carnes, de 0.06 a 0.4 $\mu\text{g/g}$, en pescados, de 0.02 a 20 $\mu\text{g/g}$. Se han informado cifras mayores a 100 $\mu\text{g/L}$ en leche de vaca. La concentración del níquel en leche materna se reporta entre 20 y 500 $\mu\text{g/L}$. El níquel puede ser transferido a los alimentos por los utensilios de cocina elaborados con níquel y en la plomería de los metales, pudiendo ocasionalmente añadir hasta 1 mg/día a la ingestión diaria promedio.

Tabaco: Los fumadores están expuestos a cantidades significativas de compuestos de níquel. En estudios realizados en diversos países, se ha encontrado el contenido de níquel en cantidades que fluctúan en el rango de 2 a 6.2 μg por cigarrillo. Aproximadamente del 10 al 20% del níquel es liberado en el humo del cigarro y puede ser inhalado posiblemente como carbonilo de níquel. (Lars, F, y su grupo 1990. Aubert, H; Pinta, M. 1980).

II.1.5. Poblaciones Expuestas

El riesgo de la exposición al níquel está relacionado fundamentalmente, con el tipo de compuesto y la vía de exposición. Los sectores de la población que pueden estar mas expuestos incluyen el ocupacional, las personas cuya dieta contiene en forma natural un alto contenido de níquel, y las personas que viven cerca de una instalación de procesamiento de níquel y las que fuman tabaco.

Asumiendo que en el hombre, el promedio de la tasa de respiración es de $20\text{m}^3/\text{día}$, los valores típicos de exposición diaria al níquel por inhalación han sido estimados entre 20 y 200 ng/día en zonas rurales y de 200 a 1200 ng/día en las áreas urbanas.

Si tenemos en cuenta que el promedio de ingestión de agua potable en el humano (adulto) es de 2 litros/día, asumiendo una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ en agua.

Se ha calculado la ingestión diaria de níquel, en adultos a través de los alimentos, en el rango de 10 a 300 $\mu\text{g}/\text{día}$. Se reporta que fumar 20 cigarrillos al día puede resultar en la inhalación de 40 a 80 μg de níquel, semanalmente (*Morton, Lippmann y su grupo 1992*).

II.2. TOXICOCINÉTICA DEL NÍQUEL

La absorción del níquel en el hombre ocurre fundamentalmente a través de la vía respiratoria, la vía digestiva (dieta) y la piel. Las cantidades relativas de níquel absorbidas por el organismo están determinadas por la cantidad inhalada, ingerida en contacto o administrada; así como, por las propiedades fisico-químicas del compuesto, siendo la solubilidad un importante factor en todas las rutas de absorción.

Generalmente la absorción de las sales solubles de níquel es rápida pues se disocia fácilmente en el ambiente acuoso de las membranas biológicas, lo que

facilita su transporte, en contraste con la pobre absorción de los compuestos insolubles del metal.

La absorción respiratoria es generalmente la principal vía de entrada del metal al organismo. Las partículas con diámetros mayores de 10 μg son retenidos predominantemente en la mucosa nasal y traqueo bronquial, pudiendo las partículas menores alcanzar los alvéolos pulmonares.

La deposición de partículas en los pulmones, procedentes del aire ambiental, puede ser aproximadamente de un 30% del níquel inhalado, teniendo una tendencia a acumularse en el tejido pulmonar y en las glándulas linfáticas regionales. De acuerdo a la solubilidad del compuesto, solamente una parte del compuesto retenido puede alcanzar la sangre, calculándose el promedio de la captación sistémica en alrededor de un 20% de la dosis inhalada.

Su absorción por el tracto gastrointestinal ocurre generalmente por ingestión de alimentos, bebidas o aguas.

La absorción gastrointestinal del níquel y de sus compuestos por la dieta en el hombre es pobre (1-5% de la dosis ingerida) y depende generalmente de la solubilidad de la sustancia, siendo los compuestos solubles los que más se absorben en comparación con los insolubles. Gran parte del níquel ingerido permanece en el tracto gastrointestinal y es excretado en las heces.

La composición de la dieta influye en los niveles de absorción del níquel. Se refiere a que sólo una porción pequeña del metal es absorbido por vía gastrointestinal cuando está incorporado a los alimentos; sin embargo, la absorción se eleva mucho durante el ayuno. Los agentes quelantes suprimen la absorción gastrointestinal y son usados como antidotos en la intoxicación aguda por níquel. La absorción cutánea de este metal es de 55-77% en un lapso de 24 hrs (Lauwervs, R; Hoet, P. 1991).

II.2.1. Metabolismo

El níquel absorbido es transportado a través de torrente sanguíneo principalmente unido a la albúmina, L-histidina, otra fracción se une a la α -2 macro globulina níqueloplasmina.

Se acompleja también con otras moléculas ultrafiltrables, distribuyéndose en todos los órganos, pero en mayor proporción en riñón, hígado, pulmón y más en el SNP (Sistema nervioso periférico) que en el central.

La distribución en los tejidos depende de determinados parámetros tales como la forma química, la ruta de absorción, la dosis y el tiempo después de la exposición.

Las concentraciones de níquel en los tejidos y en los líquidos corporales son muy elevadas después de una exposición a compuestos solubles, mientras que las concentraciones son no detectables o muy bajas después de la exposición a compuestos poco solubles.

Eliminación: Las diferentes rutas de excreción de este compuesto dependen de la vía de exposición y la forma de presentación del metal. El níquel no absorbido por vía digestiva se excreta en las heces.

La principal ruta de excreción del níquel absorbido por todas las vías es la urinaria (90%) y los valores normales referidos son entre 2 y 5 $\mu\text{g/L}$.

Se han encontrado que otras secreciones del organismo tienen la habilidad de excretar níquel: saliva, bilis, sudor, lagrimas, cabello y leche (*Lauwers, R; Hoet, P. 1991; Berman, E. 1980*).

II.2.2. Mecanismo Tóxico del Níquel

El níquel reemplaza otros iones metálicos en enzimas y proteínas, se une a compuestos celulares que contienen átomos de O, S y N tales como enzimas y ácidos nucleicos, los cuales son inhibidos (Scott, J.J; Fordsmand. 1997).

Tiene una variedad de efectos sobre las enzimas, debido a que puede substituir otros iones metálicos divalentes, por lo que es capaz de inhibir y activar la misma enzima dependiendo de su concentración (Carson, B y su grupo 1991).

Este ión posee una gran afinidad por las proteínas. En varios casos el níquel puede desplazar el catión activo e impedir estéricamente su unión al sustrato, actúa como un efector alostérico (Hausinger, P.R. 1993).

El níquel también posee afinidad por los grupos sulfhidrilos (-SH) de las enzimas, lo que significa alteración de la forma y función de ellas, originando alteraciones fisiológicas en el organismo. Interacciona con los fosfolípidos de la membrana, incrementa la peroxidación lipídica, se une a grupos fosfato como los del ATP y sustituye al Mg^{+2} en la ATP asa. Estimula la segregación de glucagón y se acompleja con ADN y ARN y sus enzimas reguladoras (Repetto, M. 1995).

II.2.3. Efectos Toxicológicos

El níquel altera la forma y función de proteínas y enzimas, esto constituye el fundamento de los efectos tóxicos que se reflejan en los estudios de laboratorio. Los efectos por níquel son variables según, el tipo de compuesto, vía de ingreso, cantidad absorbida, tiempo, tipo de exposición, características propias del individuo expuesto y características fisicoquímicas del medio ambiente.

Efectos generales: En forma aguda provoca gastroenteritis severa, temblor, movimientos coreicos y parálisis. Localmente, irritación pulmonar, asma y neuroconiosis por vía inhalatoria y dermatosis por contacto, con gran capacidad sensibilizante.

La afectación sistémica induce eritrocitosis (valores elevados de hemoglobina) dependiendo de la concentración, retraso del crecimiento, hiperglucemia y alteraciones degenerativas en corazón, pulmón, hígado y riñón, cáncer pulmonar y gástrico, con limitada evidencia en humanos.

Manifestaciones agudas: En lo referente a los efectos en la salud humana, probablemente es el carbonilo de níquel, el compuesto de mayor toxicidad. Este compuesto, volátil incoloro y líquido se forma por el contacto de las partículas finas de níquel con el monóxido de carbono, durante el proceso de Mond, de purificación del níquel, siendo la exposición generalmente accidental en los trabajadores vinculados al procesamiento del metal.

La exposición aguda al carbonilo de níquel $Ni(CO)_4$ por inhalación, produce en una primera fase, cefalea frontal, vértigo, náuseas, vómitos, insomnio e irritabilidad, seguido de un periodo asintomático previo al establecimiento de la sintomatología más persistente e insidiosa, semejando una neumonía, dada por dolor torácico, tos seca, disnea, cianosis, taquicardia, síntomas gastrointestinales ocasionales, sudoración, trastornos visuales y debilidad.

El pulmón es el órgano blanco en la intoxicación por el carbonilo de níquel, siendo las lesiones patológicas observadas en la exposición humana aguda la hemorragia pulmonar, edemas o signos de neumonitis, además de trastornos alveolares pulmonares, degeneración del epitelio bronquial y formación de exudado fibrinoso intraalveolar. Pueden afectarse además el hígado, riñones, glándulas suprarrenales, bazo y cerebro. Las causas más comunes de muerte son la neumonitis intersticial difusa y la hemorragia o edema cerebral (Morton, L., y su grupo 1992)

Efectos dermatológicos: Actualmente está aumentando la importancia del níquel como elemento causal de afecciones dermatológicas en la población general, especialmente en las mujeres, siendo la hipersensibilidad al níquel la causa más común. Alrededor del 1-2% de los hombres y de un 8-10% de mujeres muestran

una reacción positiva en la piel a pruebas de parche con sulfato de níquel. Esto sugiere que cada vez más, la exposición no ocupacional al níquel que incluye objetos elaborados con níquel, tales como; joyas, monedas, herramientas, utensilios de cocinas de acero inoxidable, prótesis y otros. Constituye un problema de mayor significación sanitaria. La dermatitis por contacto con níquel se manifiesta al inicio con eritema papular o papulovesicular con prurito y ardor, con tendencia a la liquenificación, teniendo las características similares a una dermatitis atópica.

Efectos respiratorios: La exposición crónica por inhalación de polvos y aerosoles irritantes del metal, puede contribuir al desarrollo de enfermedades crónicas respiratorias, incluyendo asma bronquial, bronquitis y pneumoconiosis, pudiéndose también desarrollar rinitis hipertrófica, sinusitis, poliposis nasal y perforaciones del septum nasal.

Efectos en el sistema cardiovascular: Se ha descrito que pacientes con infarto agudo del miocardio y angina de pecho inestable desarrollan niveles altos de níquel en suero, seguido de vasoconstricción de las coronarias.

Efectos renales: Se han detectado efectos en casos de intoxicación aguda por carbonilo de níquel, manifestados por edema renal, con hiperemia y degeneración parenquimatosa.

Carcinogenicidad: Estudios epidemiológicos han demostrado el incremento en la incidencia de cáncer pulmonar y nasal, entre trabajadores de refineries de níquel, siendo la mayor incidencia en trabajadores vinculados a actividades de calcinación y fundición.

En una refinería se encontró un riesgo similar asociada a la electrólisis. También han sido notados incrementos en el riesgo de desarrollar otro tipo de tumores malignos, incluyendo carcinomas de laringe, riñón, próstata, estómago y sarcomas

de tejidos blandos en trabajadores de refinería de níquel (*Calabrese, J.E; Kenyon, M.E. 1991; Nieboer, E; Nriagu, O.J. 1992*).

II.3. SEDIMENTOS

Durante los últimos años el problema de la contaminación ambiental ha sido motivo de gran preocupación a nivel mundial, el desarrollo tecnológico y crecimiento demográfico han contribuido de manera importante, afectando gravemente los tres vectores de la naturaleza, aire, agua, y suelo (Vizcaino, 1986). Los cuerpos de agua se transforman en una fuente de contaminación para la flora y fauna acuática, así como para el hombre en la medida que sea contaminada por actividades antropogénicas. Esto ha traído como consecuencia el estudio de los sedimentos contaminados.

La hidrosfera es el área más importante de la tierra consta principalmente de tres fases; material disuelto, material particulado suspendido en el agua y sedimentos. Sobre el fondo de ríos y lagos se acumula material sólido en partículas, que limita inferiormente la extensión de los ecosistemas acuáticos este material recibe el nombre de sedimento. Geológicamente hablando, los sedimentos son la vía y el fin de materiales naturales y antropogénicos.

Los sedimentos contaminados con nutrientes, metales, metaloides y sustancias orgánicas pueden ser encontrados en sistemas de agua dulce y marino alrededor del mundo. Mientras algunos de estos contaminantes están presentes a concentraciones elevadas como resultado de procesos naturales, en la mayor parte de los casos se presenta debido a actividades antropogénicas (*Burton, G.A,Jr. 1992*)

II.3.1. Componentes de un Sedimento

Sedimento: Representa la acumulación de materiales arrastrados, o bien producidos en la misma masa de agua, partículas inorgánicas y orgánicas eventualmente sedimentadas sobre el fondo de un cuerpo de agua.

Por lo tanto el sedimento es generalmente una matriz de materiales y pueden ser relativamente heterogéneos en términos de sus características físicas, químicas y biológicas (Margalef, R. 1983).

Los sedimentos se pueden definir por estar constituidos por cuatro componentes principales.

1. El más grande volumen es ocupado por el agua intersticial la cual llena los espacios entre las partículas del sedimento y usualmente se encuentra por arriba del 50% del sedimento , en cuanto a volumen.
2. La fase inorgánica incluye; arcillas de rocas, fragmentos de rocas, conchas, caparzones y minerales formados en la propia agua.
3. La materia orgánica incluye; organismos enteros que mueren en el sedimento, organismos muertos y fragmentos de los mismos, excrementos y materia orgánica floculada.
4. Materiales derivados antropogénicamente incluye; materiales contaminados y erosionados de la capa superficial del suelo.

Los sedimentos constan de un amplio rango de tamaño de partículas inorgánicas, fracción gruesa (arena y materiales gruesos mayores de 62 μm de diámetro) y fracción fina (arcillas y materiales menores de 62 μm de diámetro). La fracción gruesa esta constituida principalmente, de materiales inorgánicos estables; silicatos que son no cohesivos y generalmente no asociados con la contaminación química. La fracción fina está constituida de aluminosilicatos (arcillas), las cuales son partículas con un área superficial relativamente grande y frecuentemente tienen cargas eléctricas superficiales originando que éstas puedan ser más reactivas, química y biológicamente que las arenas gruesas, lo cual incrementa la probabilidad de sorción y desorción de contaminantes (Burton, G.A.Jr. 1992).

El material orgánico tiene también propiedades desortivas liberando y atrapando contaminantes. Altas concentraciones de materia orgánica disuelta, intercambian la solubilidad y complejación de metales (Fergusson, E. 1990).

II.3.2. Rutas de Exposición

En sistemas naturales las principales rutas por las cuales los tóxicos unidos a los sedimentos pueden entrar a un sistema biológico son: Ingestión de material suspendido alrededor del agua, ingestión de contaminantes preconcentrados en el alimento; incorporación de contaminantes por sistemas fisiológicos importantes, ingestión agua de poro, de agua superficial y contacto entre el organismo y el sedimento.

II.3.3. Sedimentos Artificiales

La evaluación de sedimentos contaminados por medio de bioensayos de laboratorio más que una adición a un análisis químico es un desarrollo relativamente reciente. En donde una respuesta biológica tiene la ventaja de reflejar la porción biodisponible de un contaminante, el cual puede ser muy diferente de la cantidad total determinada por análisis químico. Estos bioensayos incorporan protocolos y rigurosos controles.

Las pruebas de toxicidad con sedimentos son necesarias para aquellas sustancias que se distribuyen y acumulan, tales como los metales pesados. Además son comúnmente la única vía para evaluar la toxicidad. En pruebas regulatorias de toxicidad de sedimentos, uno de los mayores objetivos es frecuentemente la medida de la toxicidad relativa, es por eso esencial tener un grado de estandarización. Los sedimentos naturales de ambientes marinos y de agua dulce pueden variar ampliamente en sus características, además poseen una amplia macro, meso y micro flora/fauna. Por lo tanto es necesario que la investigación se enfoque hacia la identificación de procedimientos estandarizados, de los cuales factores tales como, disponibilidad, biodisponibilidad son medidas más predecibles, repetibles y por consiguiente existe una interpretación más clara.

Esto origina la necesidad de emplear sedimentos artificiales, los cuales pueden mostrar que existe toxicidad debido a propiedades físicas, químicas o biológicas, que se presentan de manera natural proporcionando muestreos estandarizados, así como replicación temporal, espacial y reproducibilidad.

La utilización de suelos terrestres para pruebas de toxicidad en agua dulce, proporcionan un sustrato en el cual no sobrevive la macro fauna, además si son colectados localmente para pruebas de laboratorio, estos pueden ser todavía más variables en lo referente a sus características. Es por eso que a través de investigaciones se han establecido materiales con propiedades específicas los cuales son usados para la elaboración de sedimentos.

Sedimentos artificiales: Los sedimentos verdaderamente artificiales usualmente constan; de una base de arena limpia con una distribución de tamaño de partícula definido una fracción de arcilla y contienen una proporción fija de materia orgánica.(SETAC. 1993).

II.3.4. Caracterización

Antes de realizar las pruebas de toxicidad se requiere de información básica acerca de las propiedades físicas y químicas del sedimento. El tipo de caracterización necesario para el sedimento depende de los objetivos de estudio y los contaminantes de interés; sin embargo un mínimo de parámetros deben ser incluidos debido a que influyen en la toxicidad y pueden proporcionar datos de interpretación. Las medidas recomendadas incluyen: Temperatura, tamaño de partícula, humedad, pH, capacidad de intercambio catiónico, conductividad, demanda bioquímica de oxígeno (DBO), oxígeno disuelto (OD) y contenido de carbono orgánico (%C) (Burton, G.A. Jr. 1992).

II.4. Ensayos Biológicos

Para evaluar el peligro de algún contaminante presente en los cuerpos de agua, se han realizado pruebas de laboratorio de toxicología. Una de las técnicas más empleadas para realizar las pruebas de toxicidad de los metales, es la determinación de la Concentración Letal Media (CL₅₀), o también conocida como Dosis Letal Media (DL₅₀) (Maciorowski, y su grupo 1980).

Bioindicadores en la Evaluación de Sedimentos Contaminados

La especie se seleccionó tomando en cuenta su importancia económica, ecológica, distribución geográfica, abundancia y disponibilidad en proporción razonable durante todo el año, sensibilidad y fácil manejo en el laboratorio (cultivables) (Apha. 1992).

II.5. INDICADORES BIOQUÍMICOS

Son aquellas respuestas bioquímicas, efectos subletales que pueden ser medidos en organismos como consecuencia de la exposición a contaminantes ambientales. Son pruebas de gran utilidad en la evaluación de sedimentos contaminados.

Los criterios para seleccionarlos son: Alta sensibilidad, confiabilidad, importancia a la salud de los organismos, dificultad técnica y practicabilidad para usos de rutina en evaluaciones de toxicidad.

Se ha sugerido que los procesos bioquímicos de organismos acuáticos sean empleados en programas de monitoreo, ayudando a la detección en sus etapas iniciales. Concentraciones bajas de contaminantes se perciben por el sistema sensorial y celular de los organismos acuáticos y cuando la exposición es persistente, se alcanza el umbral necesario para dar una respuesta bioquímica dentro de un período de minutos a días, semanas o meses dependiendo del nivel de cada organismo.

Los indicadores basados en medidas hematológicas y reacciones enzimáticas son considerados altamente sensibles, han sido usadas históricamente para evaluar el estado fisiológico y nutricional de poblaciones de peces.

II.5.1. Hemoglobina

La hemoglobina es el compuesto más importante en la vida del eritrocito, es una proteína que en los vertebrados funciona como portador de oxígeno desde los pulmones hacia los tejidos, la presencia de hemoglobina en el organismo incrementa 70 veces aproximadamente la capacidad portadora de oxígeno en la sangre.

La hemoglobina tiene un peso molecular de 68,000 daltons, es una proteína conjugada, está formada por una proteína específica llamada globina y un complejo de porfirina de hierro, el hem. La porción hem explica el color rojo característico de la hemoglobina por el cual se clasifica como cromoproteína. En cuanto a estructura real, como unidad molecular activa, la hemoglobina está formada por cuatro cadenas peptídicas agrupadas por pares, dos α y dos β , sobre cada una de las cadenas peptídicas se fija un grupo no proteínico portador de oxígeno llamado hem. Este es un complejo de hierro y protoporfirina (una estructura de anillo con una red de cuatro grupos llamados pirroles que contienen cada uno cuatro carbonos y un nitrógeno). Cada átomo de hierro puede llevar una molécula de oxígeno.

Síntesis de la hemoglobina: Está síntesis se puede dividir en tres fases importantes.

En la primera fase se combina el ácido aminado glicina y la succinil CoA, en presencia del fosfato piridoxal, en una serie de etapas se forma porfobilinógeno, derivado del anillo pirrólico. En la siguiente etapa, se condensan cuatro moléculas de porfobilinógeno en forma apropiada apareciendo una estructura de anillo cerrado, que por descarboxilación y otros cambios se transforma en protoporfirina.

La síntesis de la hemoglobina termina con la incorporación del hierro a la protoporfirina, para formar hem y la unión de las cadenas específicas de la globina con dicho hem.

La síntesis de hemoglobina tiene lugar en la médula roja, en el interior del eritrocito en maduración (Toporek, Milton. 1983; Ganong W. 1984).

La función principal de la hemoglobina es el transporte de oxígeno por la sangre. Este transporte se lleva a cabo por la capacidad que tiene la hemoglobina para combinarse con el oxígeno en forma reversible.

II.5.2. Determinación In Vitro de la Actividad de las Esterasas de *M. macrocopa*

Las colinesterasas son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en todo el reino animal y vegetal. Forman parte del grupo de las esterasas o hidrolasas de los enlaces tipo éster, es decir los constituidos por la unión de ácidos orgánicos o inorgánicos con alcoholes o tioles de muy diferente naturaleza.

Las colinesterasas son un grupo muy importante de enzimas, en particular la enzima Acetilcolinesterasa (AChE o Achasa), cuya estructura, mecanismo de acción y determinación genética es muy constante en todo el reino animal, se encuentra en mamíferos y en el hombre fundamentalmente en el sistema nervioso central y placa motora, así como en eritrocitos; también en riñón, páncreas, bazo, hígado y linfocitos.

La enzima (AChE) interviene en la restauración de la excitabilidad de la membrana posináptica, degradando el neurotransmisor Ach después de cada impulso. Una característica llamativa de la AChE es su elevado número de recambio de 25,000 μ seg, lo que significa que hidroliza una molécula de Ach en 40 μ seg. El alto número de recambio en la enzima resulta esencial para la

restauración rápida del estado polarizado de la membrana posináptica (Christoper, Van Hole. 1990).

La Ach es hidrolizada en colina y ácido acético por dos enzimas, una llamada colinesterasa verdadera que se localiza en los eritrocitos y tejido nervioso y la otra denominada pseudocolinesterasa, que se encuentra principalmente en el plasma. Estas dos enzimas se distinguen entre sí por sus diferencias en afinidad con distintos ésteres de la colina y susceptibilidad a los inhibidores. La colinesterasa verdadera es más activa para hidrolizar Ach, acetil- β -metilcolina en menor proporción y no desdobra a la butiril o benzoilcolina. La pseudocolinesterasa hidroliza la acetilcolina, benzoil y butirilcolina.

La enzima AChE posee en su estructura proteica una porción responsable de su actividad catalítica, que consta de un centro esterásico y uno aniónico, en el esterásico se efectúa la hidrólisis del sustrato (Ach).

Para los crustáceos se tiene plenamente identificadas tres sustancias neurotransmisoras, las cuales son: acetilcolina (Ach), ácido γ -aminobutírico (GABA) y el ácido glutámico, estos neurotransmisores se encuentran en altas concentraciones en neuronas presinápticas, aunado con otras enzimas que regulan y trabajan de manera conjunta.

Las propiedades tóxicas de los inhibidores de la acetilcolinesterasa son de suma importancia ecológica (Vander, Welling. 1989; Schoor, Brausch. 1980), ya que son diversos los organismos acuáticos que poseen sistema nervioso, entre ellos son: los moluscos, peces, lombrices acuáticas y crustáceos entre otros, tienen un sistema nervioso no muy desarrollado; sin embargo, esencial para regular funciones importantes como el movimiento, alimentación y reproducción (Barnes. 1987), las esterasas pueden ser estimuladas o inhibidas por diferentes contaminantes de acuerdo a su estructura química.

Inhibición de las Colinesterasas: Tras exposición continua o repetida a diferentes organofosforados, carbámicos y otros compuestos orgánicos e inorgánicos, parece ser que se desarrolla tolerancia, aunque los niveles de AChE se mantengan bajos. Se postula que se produce inducción de las enzimas necesarias para la detoxificación del producto o que disminuya la sensibilidad de los receptores a la acetilcolina. Por otra parte se ha observado en humanos y comprobado experimentalmente en ratas, que ante una primera exposición a dosis bajas de determinados organofosforados (por ejemplo etilparatión) las colinesterasas sufren un incremento inicial antes de manifestarse la inhibición. Este fenómeno es más común en la AChE que en la ChE. (Sanz, y su grupo 1991). Además de los plaguicidas citados, existen otros agentes neurotóxicos que son inhibidores más o menos potentes de las colinesterasas: Algunos metales como sodio, cinc, cobre, plomo; el mercurio tanto metálico, en forma de vapor o de cloruro o el metilmercurio y litio. Aunque su acción inhibitoria se discute, parece ser que su unión a la enzima reduce la afinidad por el sustrato.

Estimulación de la actividad colinesterásica: Los agentes estimulantes de la AChE provocan, por el contrario, un bloqueo de la transmisión colinérgica. Aunque con resultados controvertidos, particularmente en el caso de Al^{3+} , se ha implicado el Mg^{2+} , el Ca^{2+} , Sn^{2+} y Hg^{2+} , también el acetato amónico y el vanadato, elevan la actividad colinesterásica, no obstante, con el cloruro mercúrico en administración repetida tras una estimulación inicial, aparece una disminución de la actividad.

Mientras que el mecanismo de acción de los agentes inhibidores suele estar bien establecido, se sabe poco sobre los mecanismos de activación, aunque se postula activación de tipo alostérico en el caso de aluminio y otros iones metálicos (Repetto, M. 1995).

Las ventajas de emplear indicadores bioquímicos son: Permiten una observación directa de los daños por tóxicos, son fáciles de manejar, se pueden obtener resultados reproducibles, además un porcentaje alto de organismos de diversos

niveles tróficos poseen estas enzimas. La actividad enzimática es alterada por la exposición a metales pesados, pesticidas, hidrocarburos del petróleo y detergentes entre otros.

El níquel induce efectos a nivel post-traslacional incluyendo interacciones a nivel directo o indirecto con la función de enzimas metabólicas o proteínas estructurales. Estas interacciones pueden inducir a algunos pero importantes cambios celulares (Carson, B, y su grupo 1991).

II.6. Espectrofotometría de Absorción Atómica

Diversas investigaciones por más de 20 años se han interesado en la toxicidad de metales pesados para la vida acuática. Durante este tiempo ha habido un rápido crecimiento de estudios de toxicidad, en parte estimulado por el perfeccionamiento en la capacidad analítica debido al desarrollo de la Espectrofotometría de Absorción Atómica o (AAS). Los grandes adelantos permiten el análisis cuantitativo de un amplio rango de metales a concentraciones de mg/L (pmm), lo que ha animado a los investigadores a comprometerse a aplicar este análisis en pruebas de toxicidad con un amplio rango de complejidad desde la evaluación de concentración letal a corto plazo, hasta estudios de ciclo de vida (Geoffrey, Mance. 1987).

La Espectrofotometría de Absorción Atómica es una técnica que estudia la absorción de la energía radiante por átomos, se aplica al análisis cuantitativo. Es útil para determinar trazas de 64 elementos. Es una técnica muy sensible y puede cuantificar los elementos en concentraciones del orden de ppm ($\mu\text{g/mL}$), es altamente específica, precisa y casi libre de interferencias.

En el proceso de absorción, el átomo está constituido por un núcleo rodeado de electrones, cada elemento tiene un número específico de electrones que está directamente relacionado con su núcleo atómico y da una estructura orbital, la cual es única para cada elemento. Los electrones ocupan posiciones orbitales en

una forma predecible y ordenada. La configuración más estable y de más bajo contenido energético es conocida como estado basal.

Si a un átomo se le aplica energía de una longitud de onda apropiada, ésta será absorbida por el átomo e inducirá que un electrón sea promovido a un orbital externo, este estado se le conoce como excitado, el cual es inestable; el átomo inmediatamente retornará a su estado basal y el electrón por lo tanto regresará a su orbital inicial estable emitiendo energía radiante en la región ultravioleta-visible. Como resultado el espectro de absorción atómica, consiste en líneas discretas de absorción muy finas.

El objetivo principal de la Espectrofotometría de Absorción Atómica con llama es determinar la cantidad de un elemento en una muestra mediante su absorción dentro de una llama. Para fines cuantitativos es necesario correlacionar el dato de absorbancia con la concentración del elemento que se va a determinar. El grado de absorción depende de la concentración de los átomos.

El análisis cuantitativo por absorción atómica se apega a la ley de Lambert y Beer que implica la relación directa entre la cantidad de energía absorbida y el número de especies absorbentes. La energía absorbida tiene asociada una longitud de onda característica para cada elemento, esta ley está dada por la siguiente relación:

$A = abc$ en donde

A = absorbancia

a = coeficiente de absorción, constante para un mismo elemento

b = longitud de la celda (constante)

c = concentración de la especie absorbente

De manera simple relaciona directamente, la absorbancia medida en el instrumento con la concentración de las especies absorbentes para una serie de condiciones constantes en la manipulación de las muestras y en el equipo. La aplicación práctica de esta radiación consiste en determinar la absorbancia de una serie de soluciones patrón de concentración conocida, construir una gráfica que nos relacione estas dos variables y en esta gráfica interpolar el valor de absorbancia de una muestra de concentración desconocida para conocer su valor (Hobart, H; Willard, y su grupo 1991; Skoog, D. 1995).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El níquel y todos los contaminantes químicos de cualquier origen acaban por llegar a los sedimentos, los cuales actúan como absorbentes naturales, por lo que la persistencia del metal en el ambiente, toxicidad a altas concentraciones, tendencia a acumularse en los tejidos de la biota y su futura acción en el hombre dependerá de la concentración total del metal en el sedimento, así como de las propiedades físicas y químicas de este. Es necesario detectar y evaluar la toxicidad de los metales pesados o agentes contaminantes, mediante trabajos de bioensayos con sedimentos en los cuales se simulan las condiciones naturales de la actividad o cambio activo del metal en el sistema; se evalúa si un contaminante o químico sembrado en el sedimento es biodisponible, es decir si se presenta en una forma o fase la cual cause una respuesta biológica en una ó más de las especies con las que ha llegado ha estar en contacto.

Es por eso que el uso de un sedimento artificial es importante para realizar evaluaciones de toxicidad estandarizadas; que permitan obtener resultados en menor tiempo y estos sean independientes de la variación de temporada, que estén libres de cualquier contaminante y proporcionen muestreos estandarizados, así como replicación espacial, temporal y reproducibilidad.

Por todo lo anterior se ha hecho patente la necesidad de realizar un diseño experimental el cual permitiera fortalecer las bases para la evaluación del efecto tóxico del níquel en sedimentos artificiales sobre la especie *Moina macrocopa*, a través de estudios básicos estandarizados, sencillos, rápidos y económicos con microorganismos que puedan encontrarse en cualquier ambiente y que además permitan cuantificar y evaluar de manera real y sensible los distintos grados de contaminación y los cambios en los distintos niveles tróficos, así como obtener información que sirva de criterio, para establecer un rango permisible de toxicidad

de manera que no afecte la vida acuática del sistema, garantice la sobrevivencia de los organismos acuáticos y evite el peligro de la bioacumulación previniendo el daño a las especies que forman parte de la cadena alimenticia.

IV. OBJETIVOS

A. GENERAL

Determinar la toxicidad del níquel en sedimentos artificiales; mediante la cuantificación de proteínas, hemoglobina y actividad de la acetilcolinesterasa sobre la especie *Moina macrocopa*, así como la cuantificación de la concentración de níquel en fase acuosa y sedimento por Absorción Atómica.

B. PARTICULARES

1. Preparación del sedimento artificial para sistemas de agua dulce.
2. Caracterización física y química del sedimento artificial (pH, humedad, contenido de carbono y materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, oxígeno disuelto y conductividad).
3. Evaluar la Concentración Letal Media CL_{50} del níquel en agua y sedimento sobre la especie *Moina macrocopa*.
4. Evaluar la toxicidad subletal del níquel en sedimento, sobre el metabolismo de *Moina macrocopa*; cuantificando la concentración de proteínas, hemoglobina y actividad de la acetilcolinesterasa.
5. Cuantificación de níquel en fase acuosa y sedimento por Absorción Atómica.

6. Conocer la biodisponibilidad del níquel, correlacionando las características físicas y químicas del sedimento, con los niveles de concentración del níquel y con el efecto que se produce sobre *Moina macrocopa*.

V.HIPÓTESIS

Sí el níquel está presente en un sedimento, el cual contiene; compuestos orgánicos e inorgánicos (arena, caolinita, composta de vaca) que favorecen su almacenamiento y liberación, entonces al exponer al organismo *Moina macrocopa* a estos sedimentos, se incrementa la probabilidad de que se genere un efecto tóxico sobre el metabolismo de estos organismos reflejandose en la concentración de proteínas, hemoglobina y actividad de la acetilcolinesterasa el cual a su vez dependerá de la biodisponibilidad de níquel en el sistema.

VI. MATERIAL

* Material Biológico

Nombre Científico	Nombre Común
<i>Moina macrocopa</i>	Pulga acuática

* Material del sedimento artificial

Composta de vaca se recolectó del establo
Arena (malla 80-100)
Caolinita

Material de vidrio básico

Frascos de vidrio de boca ancha con capacidad para 100 mL

Frascos de vidrio de boca ancha con capacidad para 4 litros

Matraz Erlenmeyer con capacidad para 25, 50, 100, 250, 500, y 1000 mL

Matraz kitazato con capacidad para 250 y 500 mL

Pipetas Pasteur

Pipetas graduadas 1, 5 y 10 mL

Pipetas volumétricas 1, 2, 3, 4, 5, 10, y 20 mL

Tubos de ensayo con capacidad para 5, 13 y 70 mL

Vasos de precipitados de 50 y 100 mL

Probeta de vidrio de 10, 25, 50, y 100 mL

Embudo de vidrio de tallo corto y largo

Matraz volumétrico con capacidad de 10, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 mL

Vidrio de reloj

Portaobjetos y cubreobjetos

Bureta de 25 y 50 mL

Cajas petri

Tubos de vidrio para homogeneizar tejido de 5 y 10 mL

Material diverso

Piseta

Perilla

Frascos de Polietileno de 50 mL

Soporte Universal

Anillo de hierro

Algodón

Papel filtro WHATMAN No. 42

Papel glaseen

Equipo e Instrumentos

Balanza analítica Mettler H10

Balanza semianalítica OHAUS Mod. A 8952

Espectrofotómetro uv- visible Varian DMS 90

Estufa Ríos Rocha Mod. HS-33 serie HSML 0-200 °C

Centrifuga 5000 r.p.m. marca Sol-Bat

Refrigerador Mabe

Refrigerador Ojeda

Centrifuga refrigerada Hermle Z360 K T° -20 a 40 °C y de 0 a 14000 r.p.m.

Homogenizador de 100 a 12000 r.p.m. Mod 563C

Horno de microondas Panasonic

Microscopio

Micropipetas

Oxímetro YSI Mod. 50B

pH Meter. Beckman

Conductivitymeter Hanna HT 8733

Baño María Riossa 0 a 60 °C

Parrillas de calentamiento con agitación magnética. Londnerg

Bomba de vacío IRF3 serie J96

Espectrofotómetro de Absorción Atómica Varian AA-1475 series

Tamices No. de malla 20, 30, 40 y 80

Lámpara de cátodo hueco para Níquel

Campana de extracción

Reactivos

Cloruro de calcio

Hidróxido de sodio

Cloruro de sodio

Bicarbonato de sodio

Sulfato de calcio

Sulfato de magnesio

Cloruro de potasio

Carbonato de sodio

EDTA-sal

Cloruro férrico hexahidratado

Fluoruro de sodio

Sulfato ferroso

Trizma base

Clorhidrato de hidroxilamina

Albúmina sérica bovina

Azul de comasie

Cianuro de potasio

Sulfato de níquel hexahidratado

Cloruro de Acetilcolina

Acetona

Ácido sulfúrico concentrado

Ácido fosfórico 85%

Ácido nítrico concentrado

Agua desionizada

Dicromato de potasio

Difenilamina

Cloruro de amonio

Hidróxido de amonio

Eriocromo Negro T (ENT)

Cloruro de magnesio

Acetato de amonio

VII. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

VII.1. MÉTODO

Comprendió las siguientes etapas; preparación del sedimento artificial, caracterización física y química del sedimento. Preparación del material biológico, evaluación de la concentración letal media CL_{50} sobre la especie *Moina macrocopa*, selección de las concentraciones de prueba, bioensayos de exposición corta (daños subletales), medición al término del bioensayo de los niveles de proteínas, hemoglobina y actividad de AChE de *Moina macrocopa*. Cuantificación de los niveles de concentración de níquel en fase acuosa, y sedimento por Espectrofotometría de Absorción Atómica, a una longitud de onda de 232 nm, y procesamiento estadístico de la información.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

VII.2. Preparación del sedimento artificial para sistemas de agua dulce

El sedimento artificial contiene los siguientes porcentajes expresados en peso seco.

70% de arena (50% de partículas 0.05 mm-0.2 mm), 20% de caolinita (<0.002mm) y 10% de composta de vaca (estiércol de vaca) (0.2mm). La composta es traída de un establo de Tlalpizahuac, Estado de México. Transportar al laboratorio, desmenuzar e inactivar en una estufa a temperatura de 55-60 °C durante 3 días. Posteriormente macerar en un mortero de porcelana y pasar por un tamiz de malla 80 (0.2 mm).

Esterilizar las muestras tamizadas en una olla de presión, durante 3 ciclos de 15 minutos a 121 °C, con intervalos separados de una hora.

Lavar la arena con ácido nítrico, posteriormente esterilizar por separado arena y caolinita.

Mezclar la arena, caolinita y composta de vaca en los porcentajes ya indicados.

Almacenar el sedimento obtenido en botes de plástico para proteger las muestras del aire, humedad y del polvo.

VII.2.1. Caracterización Física y Química del sedimento

Procedimiento para determinar la humedad en sedimentos.- Colocar 10 g de muestra en charolas de aluminio puestas a peso constante a ($110\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$), secar las muestras 24 horas en la estufa (misma temperatura) en seguida retirar de la estufa, tapar y dejar enfriar en un desecador para pesar a temperatura ambiente.

Procedimiento para determinar pH.

Fundamento.- El electrodo de vidrio facilita la medición del pH en una solución, el valor se registra al medir la diferencia de potenciales a través de una membrana especial de vidrio que tiene una solución de pH conocido por un lado y la solución de pH por el otro. El pH se mide en una solución acuosa, para conocer el pH activo ó en solución salina para conocer el pH potencial.

Procedimiento.- Pesar 50 g de sedimento, añadir 125 mL de agua destilada o KCl 1 M, con lo que se tiene una relación 1:2.5. Agitar durante 2 horas a 200 r.p.m. Dejar reposar 24 horas. Calibrar el potenciómetro con soluciones amortiguadoras de pH 7 y 10. Introducir los electrodos y tomar la lectura del pH, del sobrenadante.

Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).

Fundamento.- El procedimiento involucra desplazar los cationes que se encuentran adsorbidos al complejo de intercambio, con un exceso del catión reemplazante. Siendo el amonio el catión reemplazante y la cantidad de catión adsorbido se determina por titulación.

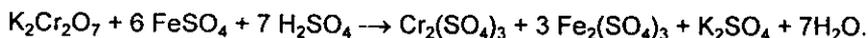
Procedimiento.- Pesar 6 muestras de 0.5 g de sedimento, mezclar cada una con 100 mL de acetato de amonio 1N, agitar y dejar reposar 30 minutos. Filtrar a través de papel filtro poro mediano hacer dos lavados con porciones de 10 mL de la disolución anterior. Al filtrado adicionar 10 mL de solución amortiguadora y 0.1 mL de indicador Eriocromo Negro T (ENT). Titular el filtrado con solución estandarizada 0.05M de etilendiaminetetracetato disódico (EDTA) hasta el vire de rojo a azul puro. Realizar la determinación de un blanco y calcular la (CIC).

Determinación de Materia Orgánica (M.O) y Carbono Orgánico (C.O) por vía húmeda.

Fundamento.- Determinar el porcentaje de materia orgánica (% M.O y C.O) en sedimentos por el método de vía húmeda. El cual se basa en la oxidación de la materia orgánica sólo con el calor de reacción que se genera al mezclar el ácido sulfúrico concentrado y la solución diluida de dicromato de potasio.

Lo que queda sin reaccionar se titula con una sustancia reductora en este caso el sulfato ferroso, utilizando la difenilamina como indicador de oxido reducción.

Se originan las siguientes reacciones



(García , A. 1981; Aguilar, S.A. 1987).

Procedimiento.- Pesar 10 muestras de 0.2 g y transferir cada una en matraces Erlenmeyer de 500 mL. Añadir 10 mL de dicromato de potasio 1N y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Agitar vigorosamente y dejar reposar 30 minutos. Añadir 200 mL de agua desionizada, 10 mL de ácido fosfórico, 0.2 g de fluoruro de sodio y 1 mL de difenilamina. Titular con sulfato ferroso 1N hasta un vire violeta

oscuro a verde. Realizar la determinación de un blanco y calcular el % M.O y C.O.

Procedimiento para determinar la conductividad.

Fundamento.- La conductividad es una expresión numérica de la capacidad de una solución para transportar una corriente eléctrica. La medición física que se practica suele ser de resistencia, medida en ohmios o megaohmios y su voltaje a través de la célula de conductividad.

Procedimiento.- Extracto de saturación

Por triplicado pesar 150 g de sedimento en un recipiente de plástico, preparar la pasta saturada agregando agua destilada a la muestra de sedimento y agitando con una espátula. Al saturarse la pasta brilla con la reflexión de la luz, fluye ligeramente si se inclina el recipiente y la pasta se desliza fácilmente en la espátula. Dejar reposar durante 24 horas. Después de obtener la pasta de saturación está se filtra a través de papel filtro poro mediano mediante el uso de vacío.

Colectar los extractos. Calibrar el conductímetro con soluciones estándar de KCl 0.01N y 0.1N. Posteriormente enjuagar la celda con el extracto y medir la conductividad a 25 °C (Aguilar, S, y su grupo 1987).

Determinación de Oxígeno Disuelto (O.D) Método de electrodo de Membrana.

Fundamento.- El oxímetro emplea un electrodo de membrana. En el cual la delgada y permeable membrana cubre los sensores y aísla los elementos de este del ambiente, pero permite que el oxígeno y otros gases entren. Cuando se aplica un voltaje polarizado a través del sensor, el oxígeno que está presente pasa a través de la membrana y reacciona con el cátodo, originando una corriente de flujo a través del sensor.

Procedimiento.- Calibrar el oxímetro, posteriormente llenar con soluciones de muestra matraces Erlenmeyer de 250 mL, introducir el electrodo de membrana y agitar con una barra magnética. Esperar a que se estabiliza la temperatura de la muestra y enseguida tomar la lectura de oxígeno disuelto en mg/L.

II.3. Preparación del Material Biológico

Se empleó el cladóceros *M. macrocopa* obtenido del lago de Texcoco; Los organismos se lavaron y mantuvieron en un medio de agua sintética cuya composición química se muestra en la tabla No. 1.

Prueba de aclimatación: Colocar 20 g de cladóceros/peso húmedo por 20 litros de agua sintética, cuyas características físicas y químicas son: Dureza como (CaCO_3) = 160 ± 180 mg/L, se empleó iluminación natural, temperatura 20 ± 2 °C, pH: 8.1-8.3, oxígeno disuelto: 5.48-5.62mg/L, conductividad 510 micromhos/cm.

Cambiar el agua sintética del organismo (en su totalidad) 4 veces por semana y remover los organismos muertos.

Alimentar el cladóceros a base de alga *Ankistrodermus falcatus*, diluir el cultivo de alga con agua sintética, hasta obtener una dilución de 1.5×10^6 cel/mL, esta suspensión por cada 100 mL de agua sintética, sirve para alimentar a 0.2 g de cladóceros (peso húmedo) (Sánchez 1992). Después de 10 días seleccionar los cladóceros neonatos para trabajar y los cladóceros adultos para obtener las enzimas.

Composición del agua sintética para el cultivo de *Moina macrocopa*

Tabla No.1

Reactivo	Concentración g/20L de agua
MgSO ₄	2.4 g
NaHCO ₃	3.48 g
KCl	0.16 g
CaSO ₄ .2H ₂ O	2.4 g

Tomada por NOM-0 74-Ecd-1994.

VII.4. Evaluación de la CL₅₀ del níquel en agua y sedimento

Evaluar la CL₅₀ apartir del límite permisible del metal para la vida acuática de agua dulce (0.01 ppm) (Hickman, 1988).

CL₅₀ en agua.- Preparar una solución estándar de 100 ppm de níquel. Apartir de está solución realizar diluciones para obtener las concentraciones empleadas. Ver (tabla No. 4).

Las cámaras de prueba fueron frascos de vidrio de boca ancha con una capacidad de 100 mL, los cuales se llevan a un volumen de 75 mL con agua sintética y con la solución del metal. Realizar cada concentración por sextuplicado, así mismo incluir 6 testigos.

Agitar las soluciones con el fin de homogeneizar, posteriormente registrar la temperatura, pH y oxígeno disuelto. En este momento introducir 10 neonatos de 0 a 24 horas de nacidos. La duración de la prueba es de 48 horas. Contabilizar la mortalidad de los organismos a las 24 y 48 horas.

CL₅₀ en sedimento.- Obtener las concentraciones empleadas apartir de una solución estándar de 100 ppm. Ver (tabla No 5).

Las cámaras de prueba fueron frascos de vidrio de boca ancha con una capacidad de 100 mL, a los cuales se adicionó el sedimento.

Procedimiento .- Para cada concentración sembrar el metal en forma de Ni²⁺ en 9 g de sedimento seco, adicionar 6 mL de agua sintética para obtener 15 mL de sedimento, agitar durante 1 hora en un agitador mecánico. Posteriormente adicionar 60 mL de agua sintética y dejar reposar durante 4 horas. En este momento introducir 10 neonatos de 0 a 24 horas de nacidos. La duración de la prueba es de 48 horas. Contabilizar la mortalidad de los organismos a las 24 y 48 horas.

VII.5. Evaluación de la Toxicidad Subletal del Níquel (en sedimentos artificiales) sobre *Moina macrocopa*.

Las pruebas que se realizaron fueron de tipo estático sin renovación y a corto plazo. La selección de las 3 concentraciones que se aplicaron a las siguientes pruebas dependieron del límite permisible del metal 0.01 ppm, un valor intermedio 0.1 ppm y la décima parte de la CL_{50} 1.2 ppm. Para ello se preparó una solución estándar de 100 ppm de níquel. Ver (tabla No 6).

Las cámaras de prueba fueron frascos de vidrio de boca ancha, las dimensiones de los frascos son de 10 x 26 cm.

Procedimiento.- Para cada concentración sembrar el metal en forma de Ni^{2+} en 150 g de sedimento seco, adicionar 100 mL de agua sintética para obtener 250 mL de sedimento, agitar durante 3 horas, enseguida adicionar 1 litro de agua sintética a cada cámara y dejar reposar 24 horas. Transcurrido este tiempo medir la temperatura, pH y oxígeno disuelto. En este momento adicionar 1 g de cladóceros peso húmedo. La duración de la prueba es de 48 horas.

VII.5.1. Determinación de Hemoglobina en el Sobrenadante

Procedimiento.- Después de 48 horas de exposición del organismo al metal en forma de Ni^{2+} pesar 0.5 g de *M. macrocopa* (peso húmedo), homogeneizar con 2 mL de solución Tris pH =7 y centrifugar a 7000 r.p.m. durante 30 minutos, a una temperatura de -5 °C en una centrifuga refrigerada, posteriormente separar el sobrenadante y tomar por triplicado alicuotas de 500 μ L, adicionar a cada una, 2 mL del reactivo de Drabkin, agitar, dejar reposar 20 minutos y determinar la absorbancia a 540 nm, en un espectrofotómetro Varian DMS'90. Utilizar como blanco el reactivo de Drankin.

VII.5.2. Evaluación de la Actividad de la Acetilcolinesterasa

Se determinó la actividad de la acetilcolinesterasa por el método de Hestrin (1949), mediante la evaluación del sustrato acetilcolina.

Procedimiento.- La determinación de la acetilcolinesterasa en las muestras, se realiza de la siguiente forma, por triplicado a 2 mL de tris buffer pH =7, adicionar 1 mL de solución de cloruro de acetilcolina, 2 mL de solución de hidroxilamina 2M (el reactivo de hidroxilamina se preparó en el momento). Posteriormente adicionar: 1 mL de HCl 4N para mantener el pH entre 1.2 ± 0.2 y 1 mL de FeCl_3 0.37M en HCl 0.1N. Por último la absorbancia del color café púrpura obtenido se determinó en un espectrofotómetro a 540 nm.

VII.5.3. Determinación de Acetilcolinesterasa de *Moina macrocopa* en presencia de Níquel en Sedimentos.

Procedimiento.- Después de 48 horas de exposición del organismo al metal en forma de Ni^{2+} pesar. 0.5 g de *M. macrocopa* (peso húmedo), homogeneizar con 10 mL de solución de tris buffer pH =7 para obtener una concentración de 50 mg de tejido/mL de homogeneizado, centrifugar a 7000 r.p.m. durante 30 minutos, a una temperatura de -5°C , en una centrífuga refrigerada Hermle Z360k, posteriormente separar el sobrenadante, (En el cual también se determinó la concentración de proteínas empleando el método de Bradford).

Del sobrenadante tomar alícuotas de 1 mL, incorporar a cada una: 2 mL de tris buffer pH =7.0, 1 mL de Ach estándar en solución acuosa a las concentraciones de 3.50, 7.01, 10.52, 14.03 y 17.54 micromoles respectivamente, incubar a 25°C durante 35 minutos, transcurrido el tiempo, detener la reacción adicionando 2 mL de clorhidrato de hidroxilamina alcalina 2M, 1 mL de HCl 4N y 1 mL de solución de FeCl_3 0.37M. Determinar la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro .

VII.5.4. Determinación de Proteínas Totales en el Sobrenadante Empleando el Método de Bradford.

La concentración de proteínas del sobrenadante fue determinada por el método de Bradford (1976).

Procedimiento.- Para la determinación de proteínas en el sobrenadante total tomar alícuotas de 15 μL , adicionar 5 mL del reactivo de Bradford, agitar, dejar

reposar 5 minutos. Determinar la absorbancia a 595 nm, en un espectrofotómetro. Utilizar como blanco el reactivo de Bradfor.

VII.6. Determinación de Níquel en Fase Acuosa

Procedimiento.- Digerir alícuotas de 10 mL de fase acuosa con 5 mL de HNO_3 concentrado durante 1 hora a 121 °C, dejar enfriar, pasar esta disolución, a un matraz volumétrico de 50 mL, aforar con agua desionizada y filtrar a través de papel filtro poro mediano.

Guardar en frascos de polietileno para su posterior lectura en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica.

Realizar un blanco de la misma manera empleando agua desionizada y preparar una curva de calibración con concentraciones conocidas para el elemento a cuantificar.

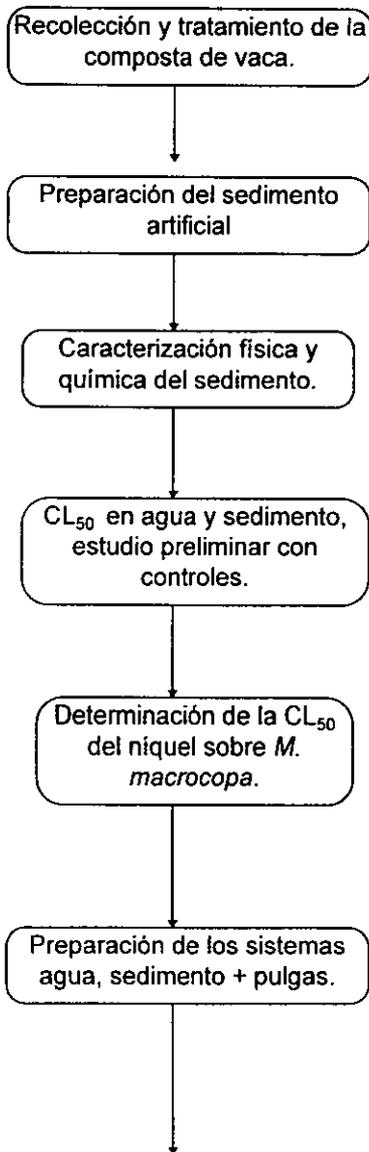
VII.6.1. Determinación de Níquel en Sedimento

Procedimiento.- Digerir 1 g de muestra con 10 mL de HNO_3 concentrado durante 2 horas a 121 °C, enfriar, pasar está disolución, a un matraz volumétrico de 50 mL aforar con agua desionizada y filtrar a través de papel filtro de poro mediano.

Guardar en frascos de polietileno para su posterior lectura en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica.

Realizar un blanco de la misma manera empleando agua desionizada y preparar una curva de calibración con concentraciones conocidas para el elemento a cuantificar.

VII.7. DIAGRAMA DE FLUJO



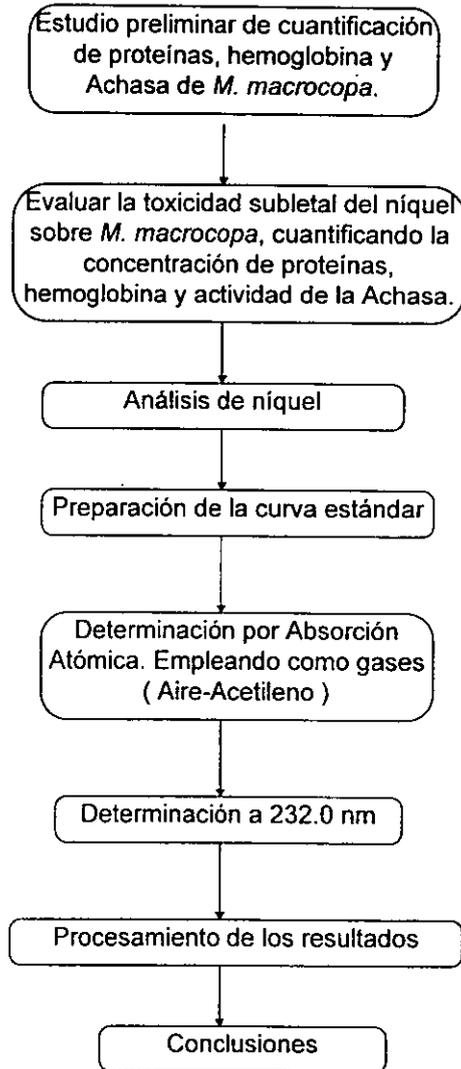


Figura 1. Diagrama de flujo para la parte experimental

VIII. RESULTADOS

La composición del sedimento artificial obtenido se muestra en la tabla No. 2.

Las características físicas y químicas del sedimento se muestran en la tabla No. 3.

En las tablas No. 4, 5, gráfico No. 1 y 2, se muestran los resultados de las CL_{50s} (dosis letal al 50%). Estos valores fueron obtenidos mediante el método Probit. (Método de Unidades Probabilísticas), el cual es utilizado para evaluar la relación dosis-respuesta de un contaminante o químico sobre un organismo, medida en términos de concentración letal media (CL_{50}).

Los resultados del efecto tóxico del níquel sobre el metabolismo de *Moina macrocopa*, determinando la concentración de proteínas, hemoglobina y actividad enzimática de la Achasa al exponer al cladóceros a concentraciones subletales, se presentan en las tablas No. 6, 7 y gráficos No.3, 4 y 5.

En el gráfico No. 6 se presenta una comparación intergrupo de la concentración de hemoglobina y proteínas producido por el níquel sobre *M. macrocopa*.

En los gráficos No. 7 y 8 se presenta una comparación intergrupo del porcentaje de estimulación e inhibición de proteínas, hemoglobina y actividad de la Achasa producido por el níquel sobre *M. macrocopa*.

Los resultados obtenidos de la concentración del metal en fase acuosa y sedimento a las 24 y 48 horas de exposición a concentraciones de 1 a 7.94 ppm, se muestran en los gráficos No. 9, 10, 11 y 12.

Los resultados de concentración de níquel en fase acuosa y sedimento, a las 48 horas de exposición a concentraciones subletales se muestran en el gráfico No. 13.

A los resultados obtenidos en las diferentes determinaciones bioquímicas y los determinados en fase acuosa y sedimento por Absorción Atómica, se les efectuó un análisis de varianza y la prueba de Tukey's (Wayne, W.D. 1996), con la finalidad de encontrar una posible diferencia estadísticamente significativa entre las medias globales. Ver anexo 4.

VIII.1. Composición del Sedimento Artificial

Tabla No. 2.

Composición del sedimento %	Tamaño de partícula
70% de arena silica	50% de partículas 0.05-0.2 mm
20% de caolinita	< 0.002 mm
10% de composta de vaca	0.2 mm

VIII.2. Características Físicas y Químicas del Sedimento Artificial

Tabla No. 3

Parámetros	
T° C	22.2 - 24
pH	7.9 - 8.00
Oxígeno Disuelto (mg/L)	5.6 - 4.9
Carbono Orgánico %	4.428
Materia Orgánica %	7.644
Capacidad de Intercambio Catiónico (meq/100 g)	66.490
Conductividad (mmho/cm)	0.640 - 0.665
Humedad %	41

Determinación de la CL₅₀ del níquel en agua sobre *Moina macrocopa*

Tabla No. 4

Nº de Dosis	Dosis [] ppm	Organismos Tratados	Organismos Muertos	Log. 10 Dosis	Mortalidad corregida %	Unidades Probits
1	1.0000	60	8	.00000	.12113	3.82582
2	2.0000	60	13	.30103	.20563	4.17502
3	3.1600	60	16	.49969	.25634	4.34279
4	3.9800	60	23	.59988	.37465	4.67915
5	5.0000	60	25	.69897	.40845	4.76743
6	6.3000	60	31	.79934	.50986	5.02545

Toxicidad aguda del Níquel en una exposición de 48 horas.
Lotes de 10 individuos

Determinación de la CL₅₀ del níquel en sedimento sobre *Moina macrocopa*

Tabla No. 5

Nº de Dosis	Dosis [] ppm	Organismos Tratados	Organismos Muertos	Log. 10 Dosis	Mortalidad Corregida %	Unidades Probits
1	1.0000	60	2	.00000	0.02521	3.03558
2	3.1600	60	7	0.49969	0.10924	3.76436
3	3.9800	60	14	0.59988	0.22689	4.24793
4	5.0000	60	16	0.69897	0.26050	4.29424
5	6.3000	60	21	0.79934	0.34454	4.47889
6	7.9400	60	27	0.89982	0.44538	4.66375

Toxicidad aguda del níquel en una exposición de 48 horas.
Lotes de 10 individuos.

Toxicidad aguda del níquel en agua sobre *Moina m.*

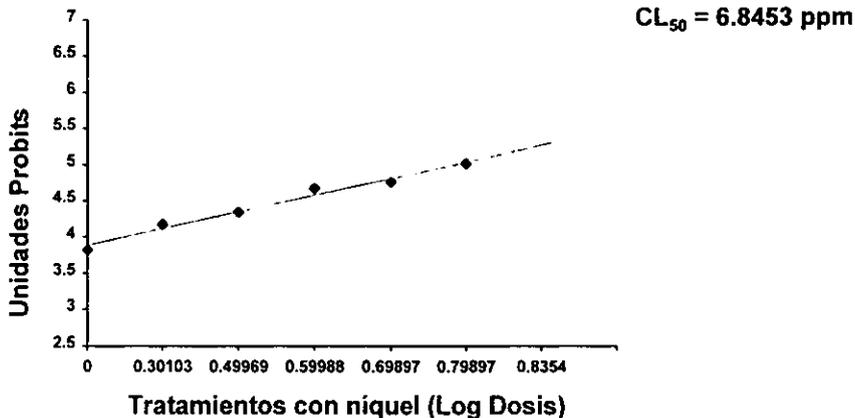


Gráfico No.1.- Para obtener la CL₅₀, se aplica el antilog al valor de la dosis correspondiente a cinco unidades Probit.

Toxicidad aguda del níquel en sedimento sobre *Moina m.*

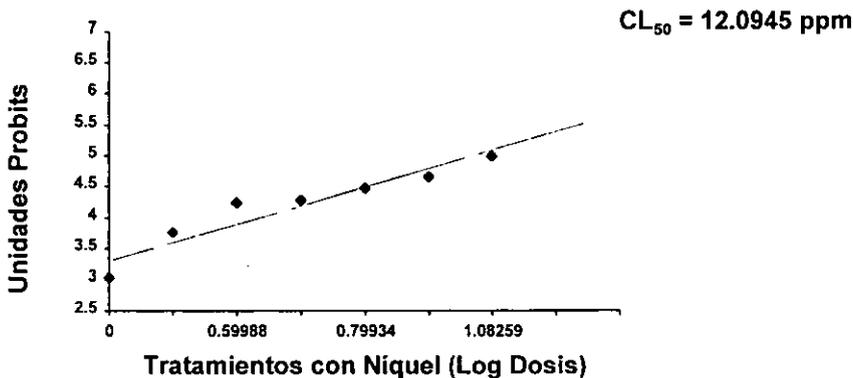


Gráfico No. 2

VIII.5. Efecto tóxico del Níquel sobre el metabolismo de *Moina macrocopa*

Tabla No. 6 Exposición a níquel en sedimentos artificiales ppm

Parámetro Bioquímico	Testigo	0.01	0.1	1.2
Proteínas mg/gph	7.742 +/- 0.548	9.182 +/- 0.156	10.601 +/- 0.263	6.046 +/- 0.120
Hemoglobina mg/gph	2.935 +/- 0.069	3.238 +/- 0.058	4.1191 +/- 0.183	2.812 +/- 0.030
Actividad de AChE $\mu\text{m Ach hidrolizada}$ /mgpr/min.	0.042 +/- 0.001	0.047 +/- 0.001	0.053 +/- 0.001	0.037 +/- 0.002

Pr = Proteínas

gph = gramos de peso humedo

El valor indicado representa la media +/- SE 9 muestras en cada grupo

Los grupos tratados difieren entre si [$p < 0.05$].**Efecto tóxico del níquel en *Moina macrocopa***

Tabla No. 7 Exposición a níquel en sedimentos artificiales ppm

Parámetro Bioquímico	Testigo	% Estimulación.	% Estimulación	% Inhibición
		0.01 ppm	0.1 ppm	1.2 ppm
Proteínas %	0.0	18.59	36.92	21.90
Hemoglobina %	0.0	10.32	40.34	4.19
Acetilcolinesterasa %	0.0	11.90	26.19	11.90

El valor indicado representa el por ciento de 9 muestras en cada grupo

Los grupos tratados difieren entre si [$P < 0.05$].

Efecto tóxico del níquel sobre la concentración de proteínas en *M. macrocopa*

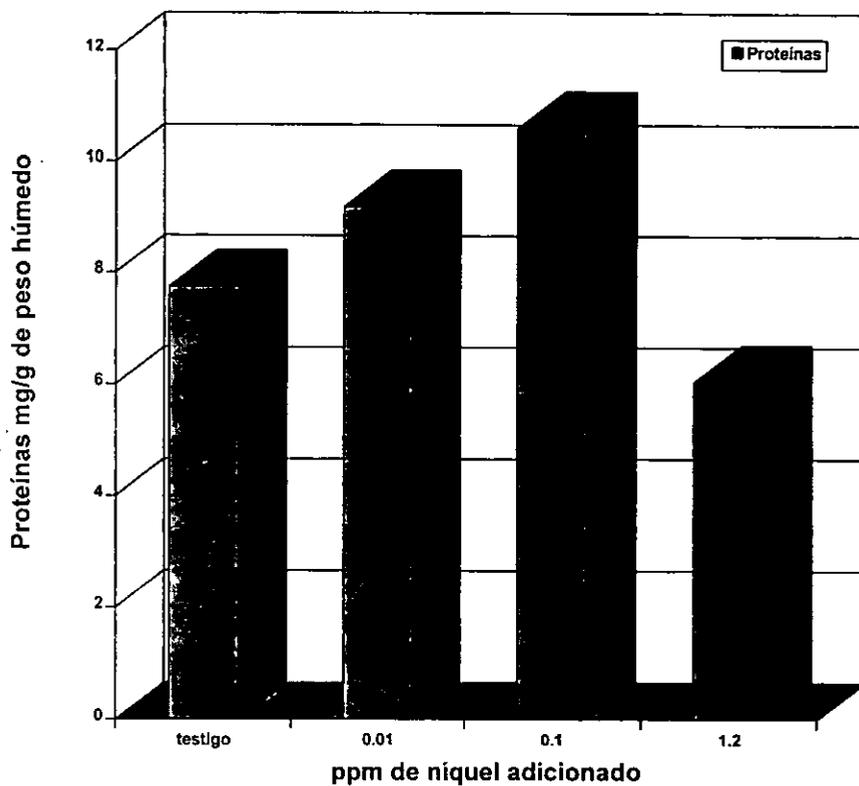


Gráfico No. 3

El valor indicado representa el promedio de 9 muestras en cada grupo. Los grupos tratados difieren entre sí [$p < 0.05$].

Efecto tóxico del níquel sobre la concentración de hemoglobina en *M. macrocopa*

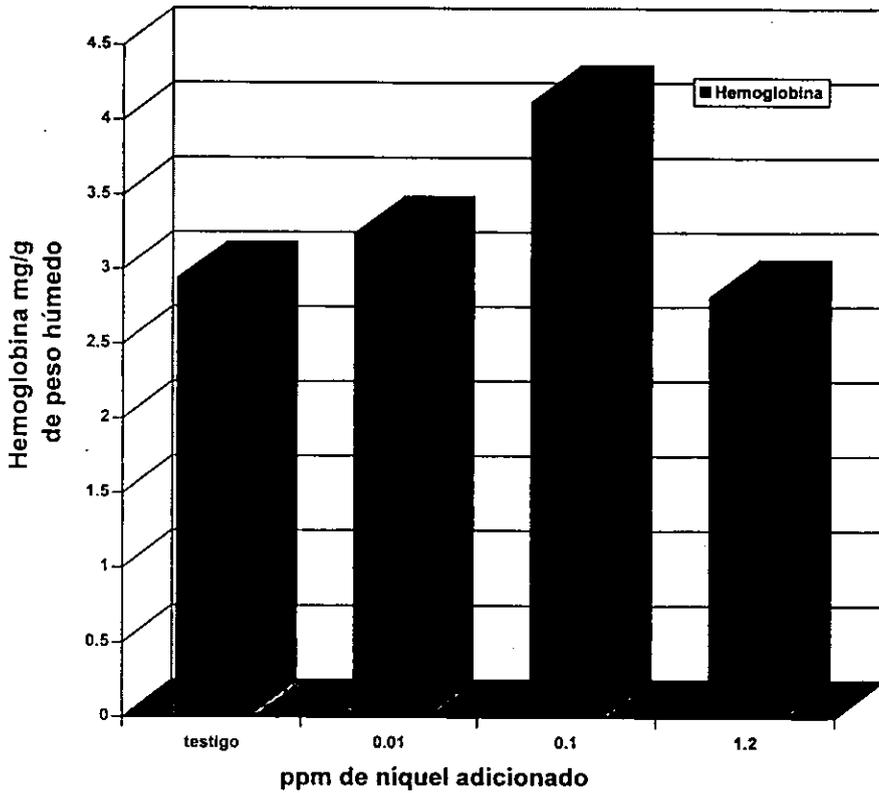


Grafico No. 4

El valor indicado representa el promedio de 9 muestras en cada grupo. Los grupos tratados difieren entre si [$p < 0.05$].

**Efecto tóxico del níquel sobre la actividad de Achasa en
*M. macrocopa***

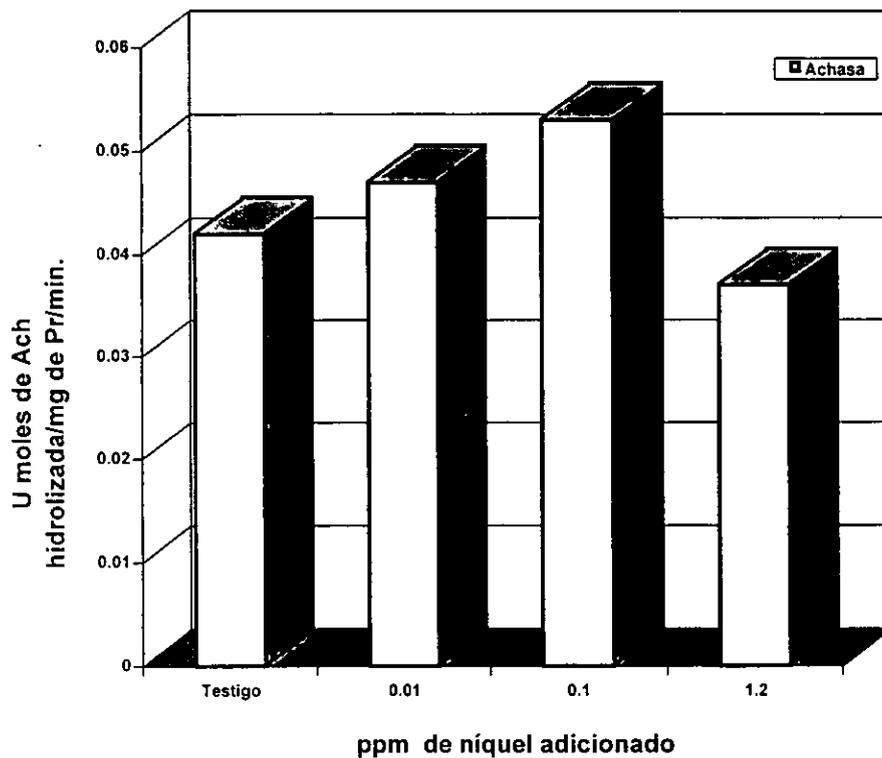


Gráfico No. 5

El valor indicado representa el promedio de 9 muestras en cada grupo.
Los grupos tratados difieren entre sí [$p < 0.05$].

Comparación intergrupo de la concentración de Hemoglobina y Proteínas producido por el níquel sobre *M. macrocopa*

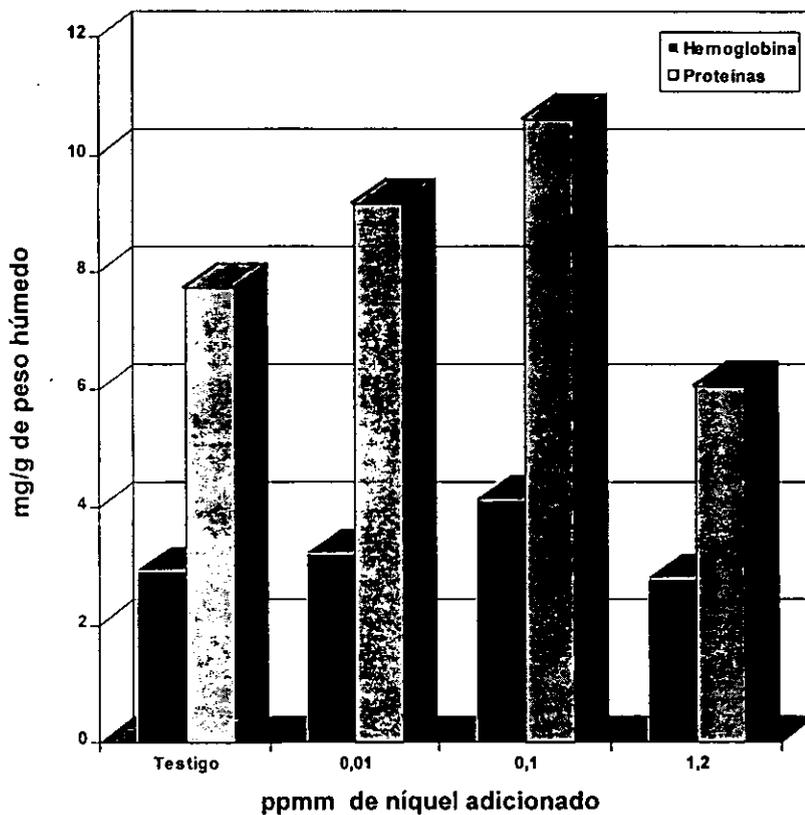


Gráfico No. 6

El valor indicado representa el promedio de 9 muestras en cada grupo.
Los grupos tratados difieren entre si [$P < 0.05$].

Comparación intergrupo del porcentaje de estimulación de proteínas, hemoglobina y Achasa producido por el níquel sobre *M. macrocopa*

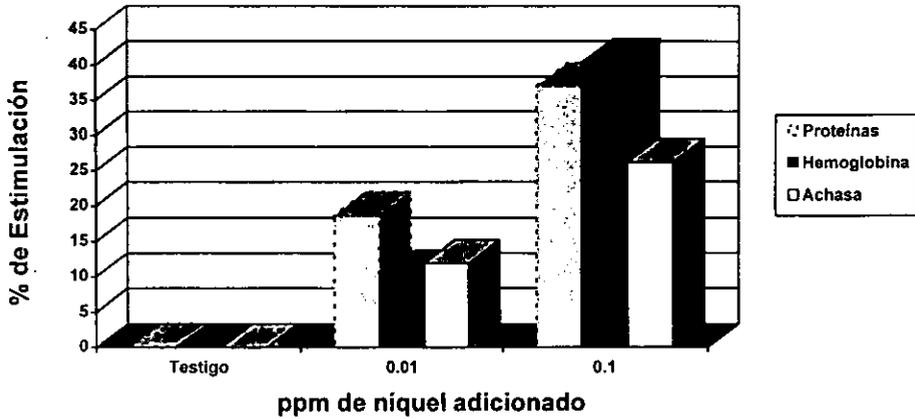


Gráfico No. 7

Comparación intergrupo del porcentaje de Inhibición de proteínas, hemoglobina y Achasa producido por el níquel sobre *M. macrocopa*

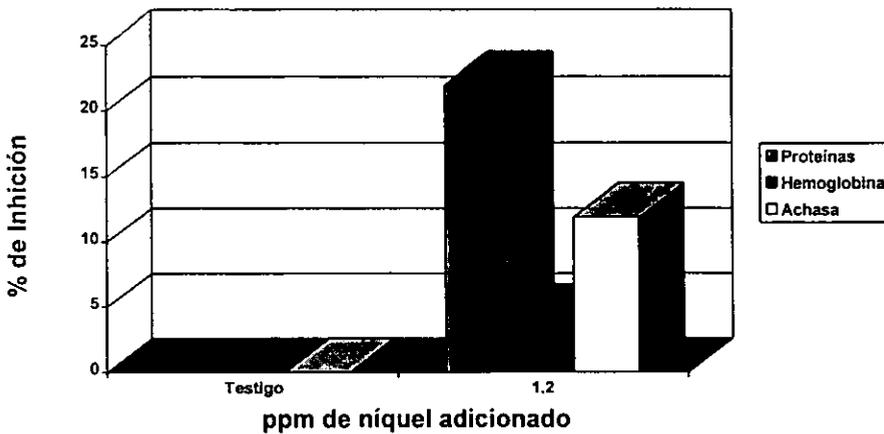
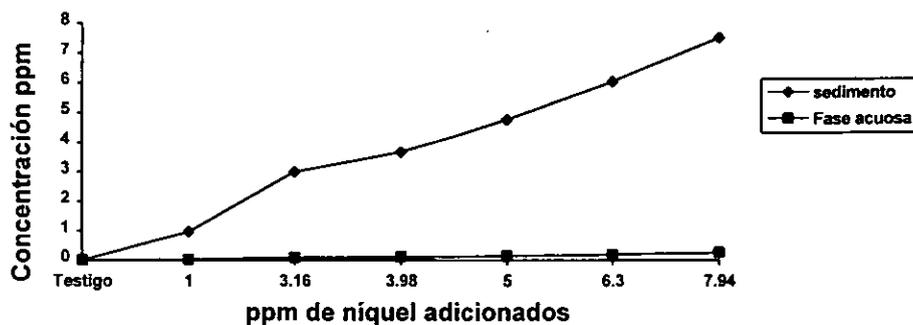


Gráfico No. 8

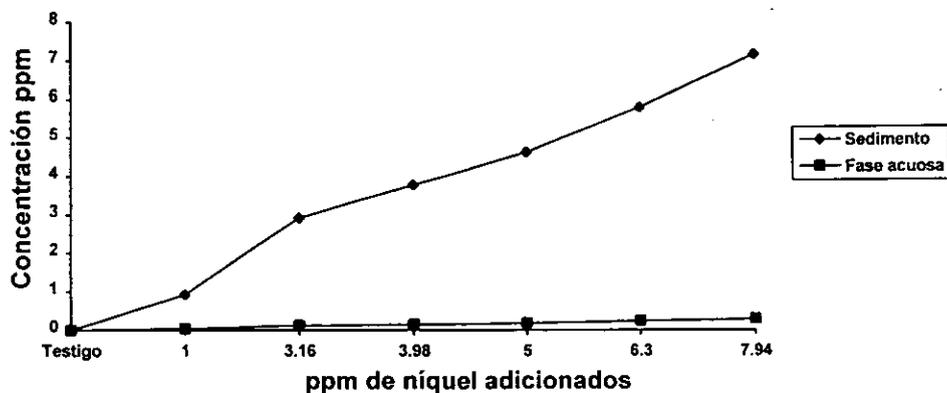
Concentración de níquel en fase acuosa y sedimento 24 horas



Ni adicionado	0	1	3.16	3.98	5	6.3	7.94
sedimento	0	0.958	3.002	3.791	4.758	6.048	7.543
F. acuosa	0	0.020	0.084	0.108	0.140	0.189	0.257

Gráfico No. 9

Concentración de Níquel en fase acuosa y sedimento 48 horas



Ni adicionado	0	1	3.16	3.98	5	6.3	7.94
Ni sedimento	0	0.931	2.934	3.671	4.642	5.832	7.182
Ni F. acuosa	0	0.037	0.117	0.148	0.187	0.236	0.298

Gráfico No. 10

Concentración de níquel en fase acuosa a las 24 y 48 horas

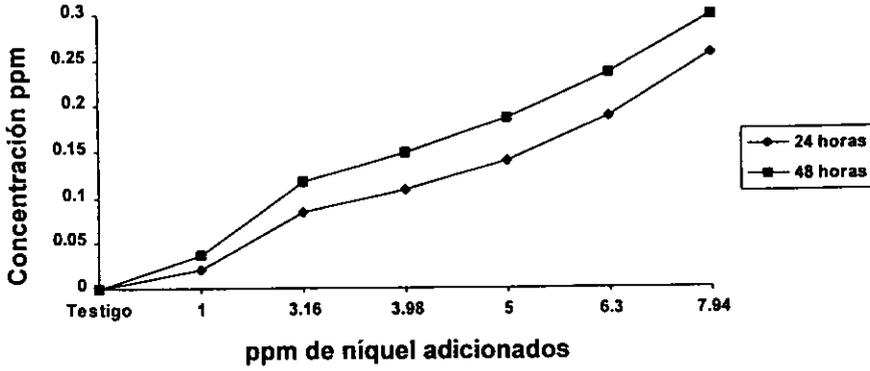


Gráfico No. 11

Concentración de níquel en sedimento a las 24 y 48 horas

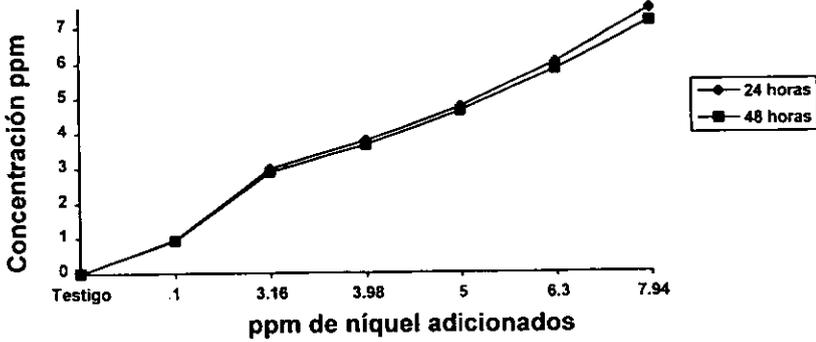
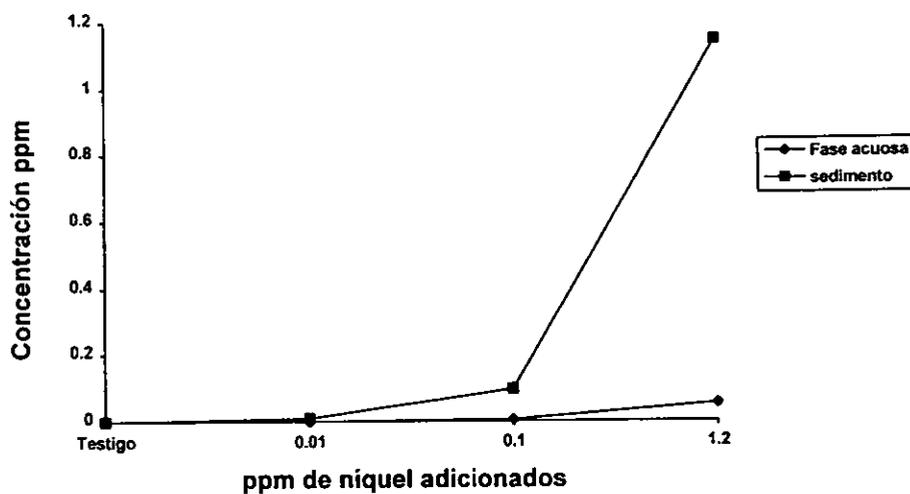


Gráfico No. 12

Concentración de níquel en fase acuosa y sedimento a las 48 horas de exposición a concentraciones subletales



Ni adicionado	T	0.01	0.1	1.2
Ni sedimento	0.0	0.0094	0.095	1.141
Ni F. acuosa	0.0	0.00043	0.0042	0.034

Gráfico No. 13

IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Este estudio se inició con la preparación de un sedimento artificial para sistemas de agua dulce de acuerdo a la guía OECD (1984). El cual consiste de los siguientes porcentajes expresados en peso seco 70% de arena sílica, 20% de caolinita y 10% de composta de vaca. Hay que mencionar que en la guía citada anteriormente se utiliza como materia orgánica sphagnum peat debido a que no fue posible adquirir este material se utilizó composta de vaca tal como lo refiere Kent J. D, y su grupo (1994).

El uso de un sedimento artificial proporciona un control relevante sobre las variables ambientales así como, replicación verdadera de tratamientos lo que facilita el establecimiento de relaciones causa-efecto (Culp, M. J, y su grupo 1996). Los bioensayos con sedimentos permiten conocer la distribución, biodisponibilidad y destino de los compuestos estudiados (Barrett, K.L. 1995).

Los sedimentos artificiales proporcionan:

- 1) Repetibilidad y reproducibilidad (tipo de sustrato estandarizado y tamaño de la muestra).
- 2) Baja variación entre las muestras (menos necesidad de replicas) debido a la estructura, tamaño estándar de la muestra y misma edad de la biota en las muestras.
- 3) Procesamiento rápido
- 4) Manipulación experimental (ejemplo: En la transferencia y en el reemplazo de muestras).
- 5) No daña al sustrato natural (Jeffrey, D.W; Madden, B. 1993).

Por lo que el uso de un sedimento artificial posee varias ventajas sobre un sedimento natural.

También se realizó la caracterización física y química del sedimento y se analizaron cada uno de los parámetros que pueden afectar la disponibilidad del níquel en el sedimento.

Con los valores de pH cuyo rango va de 7.9 a 8.0 ligeramente alcalino el sedimento es de tipo calizo por lo que se esperaban valores alrededor de pH de 8 como describe Cepeda D.M (1991), éste autor describe valores de pH que van de 7.5 a 8.5.

Recordemos que el pH es un factor importante que determina la sobrevivencia de los organismos de prueba y la disponibilidad de metales pesados, ya que valores elevados en general ayuda a la precipitación de éstos.

En lo referente a carbono y materia orgánica, la cuantificación de estos parámetros resultan de gran importancia en la evaluación de metales pesados dada la gran afinidad que estos muestran hacia los sustratos orgánicos.

Los porcentajes que reportamos para estos parámetros son de 4.42% para carbono orgánico y 7.64% para materia orgánica. Los cuales coinciden con los descritos por Barrett, K.L (1995) para sedimento artificial que son de 4.23 y 7.3%. Estos valores clasifican a este sedimento como extremadamente rico en M.O, clasificación propuesta por Moreno, D.R (1970). Estos valores tan elevados se deben a la utilización de composta de vaca como materia orgánica. Valores elevados de M.O disminuyen la disponibilidad de metales pesados debido a la formación de quelatos y complejos orgánicos.

Por otra parte para CIC se reporta un valor de 66.490 meq/100 g, esto se debe en gran parte a la cantidad de cationes procedentes del diverso material orgánico e inorgánico, ya que la composta es un material rico en sales.

El rango que se reporta para conductividad va de 0.640 a 0.665 mmho/cm el cual coincide con el que describe Colli, M.J (1990), que va de 0.640 a 0.667 mmho/cm. Ambos resultados se encuentran dentro de los límites para clasificarlos como no salinos.

Por lo que respecta a la humedad el sedimento fue mezclado en un agitador mecánico con suficiente agua hasta obtener un sedimento desmenuzable con un contenido de humedad de 41%. Se indica que se prepararon sedimentos húmedos porque para realizar los bioensayos con sedimentos se requieren sistemas con proporción 1:4, 1 parte de sedimento húmedo por 4 partes de agua (Stemmer, y su grupo 1990). El contenido de humedad obtenido coincide con el reportado por Crommentujnt y su grupo (1993) para realizar bioensayos con sedimentos el cual va de un rango de (40-60%) de humedad.

En lo referente a oxígeno disuelto, este bajó ligeramente debido a la carga de organismos y a la falta de aereación del sistema, sin embargo, la concentración se mantuvo siempre dentro del óptimo de 5.6-4.9 mg/L.

Evaluación de la Toxicidad del Níquel

Es necesario determinar su toxicidad en organismos acuáticos como *Moina macrocopa*, por ser una especie abundante e importante en diversas cadenas tróficas, sensible y buen indicador biológico de la contaminación acuática (Anuario de pesca. 1990; Dutka. 1988). Además la sensibilidad de crustáceos a metales pesados está documentada (Migliore, L; Nicola, Giudici, M. 1990).

En este estudio se realizó la evaluación de la toxicidad aguda del níquel en *Moina macrocopa*, en el cual se determinó la CL₅₀ a 48 horas, en agua y sedimento, cuyo valor fue de 6.84 y 12.09 ppm.

La CL₅₀ obtenida en agua se asemeja a la reportada por Wong, K.C (1992), el cual informa que la CL₅₀ del níquel en agua a un tiempo de exposición de 48

horas para *Moina macrocopa* es de 6.48 ppm. El valor de CL_{50} obtenido en sedimento es mayor lo cual probablemente se debe a que el níquel en los sedimentos se asocia a la materia orgánica (Vázquez, F, y su grupo 1991). También depende de la abundancia de materiales inorgánicos tales como las arcillas, las concentraciones de cationes compitiendo y ligandos en solución (Warren, A. L, y su grupo 1995).

En base a estos resultados se puede considerar que el níquel es un metal extremadamente tóxico para cladóceros y en general para hidrobiontes debido a la afinidad del metal por la materia orgánica y arcillas.

Esta consideración está aún más apoyada de acuerdo a la publicación del Manual de bioensayos elaborado por el centro de Investigación y Estudios para el control y calidad del Agua SAR (1980), existe un cuadro donde clasifican los tóxicos de acuerdo a su grado de toxicidad.

- 1) Parcialmente no tóxico. - Umbral letal agudo alrededor de 10 000 ppm
- 2) Ligeramente tóxico. - Umbral 1000-10 000 ppm
- 3) Moderadamente tóxico. - Umbral 100-1000 ppm
- 4) Tóxico. .- 1-100 ppm
- 5) Muy tóxico. .- Umbral abajo de 1 ppm

Por lo cual el níquel se cataloga como tóxico ya que las CL_{50} s son de 6.84 y 12.09 ppm.

Los materiales tóxicos existen como átomos o moléculas y como consecuencia de esto sus efectos tóxicos interactúan con sistemas biológicos a niveles de organización celular y subcelular.

La utilidad de medidas bioquímicas, las cuáles son frecuentemente clasificadas como medidas clínicas es en determinar el mecanismo de acción de sustancias químicas, bajo condiciones de laboratorio y de esta forma conocer las probables causas de efectos subletales o letales bajo condiciones de campo (Giesy, P.J ; Graney, L.R. 1989).

Son varias las medidas bioquímicas las cuales pueden ser útiles en predecir respuestas crónicas utilizando exposiciones agudas. Estas incluyen contenido de proteínas, lípidos, o concentraciones de enzimas específicas.

Considerando lo anterior en este estudio se evaluó el efecto tóxico del níquel en *Moina macrocopa*, determinando la concentración de proteínas, hemoglobina y actividad enzimática de la AChE, después de exponer al cladóceros a concentraciones subletales, utilizando un sedimento artificial.

La toxicidad subletal del níquel en *M. macrocopa* afecta claramente su metabolismo.

En el caso de la concentración de proteínas, esta se incrementó en un 18.59% y 36.92% a concentraciones de níquel de 0.01 y 0.1 ppm respectivamente y a la concentración de 1.2 ppm de níquel, hubo un decremento de proteínas del 21.90% en comparación con los controles. Indicando esto que la síntesis de proteínas en *M. macrocopa* es muy susceptible a las concentraciones de exposición del níquel (ver gráfico No. 3, 7 y 8).

El incremento en las concentraciones de proteínas probablemente se deba a la habilidad del níquel para unirse a átomos de O, N (Scott, J.J; Fordsmand 1997). Lo que hace suponer que el níquel se une a los grupos amino NH_2 y carboxilo COOH de los aminoácidos promoviendo la síntesis de proteínas y por lo tanto aumento en la concentración de estas.

La membrana funciona como barrera entre la célula y el ambiente externo e interno, mediante compartimentos celulares que engloba a los diferentes organelos dentro de la célula, controlando la entrada y salida de materiales a nivel interno y externo. Las células eucariontes se constituyen predominantemente por proteínas y lípidos (Burden, J.A; Aust, S.D. 1987).

La inhibición de la concentración de proteínas del 21.90% a una exposición de 1.2 ppm de níquel. Probablemente se deba a que a concentraciones mayores el níquel afecta la síntesis de las proteínas de las membranas celulares en un alto grado lo que origina un decremento de la concentración total de estas (Tkeshelashvili, y su grupo 1984).

Se ha encontrado que la concentración de proteínas totales de diversos organismos se ve afectada por tóxicos Giesy, P.J; Graney, L.R (1989) reportan que cuando el pez café (*Ictalurus nebulosus*) fue expuesto a 27 $\mu\text{g Cu II/L}$ durante 6 días, la concentración de proteínas totales decreció ligeramente mientras que a 49 y 107 $\mu\text{g Cu II/L}$, causó significantes elevaciones. Después de 30 días de exposición las concentraciones de proteínas totales disminuyeron notablemente.

En otro estudio realizado con trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), la cual fué expuesta in vivo durante 6 días a 24 y 39 $\mu\text{g Cu II/L}$. Las concentraciones de proteínas totales del suero se incrementaron significativamente, en comparación con los controles. Mientras que a 67.5 $\mu\text{g Cu/L}$ no hubo efectos sobre la concentración de proteínas.

Estos mismos autores reportan que al exponer alevines de trucha a concentraciones de metilmercurio (CH_3Hg) II, Cd II y Plomo II, pequeñas concentraciones de metilmercurio causan un decremento en las proteínas totales del suero, mientras que concentraciones similares de Cd causaron un incremento en las proteínas totales del suero y concentraciones grandes de Cd no tuvieron efecto sobre las proteínas totales del suero.

Los resultados obtenidos en el laboratorio y los descritos en la literatura indican que la respuesta de las proteínas totales del suero a tóxicos, son muy complejas y la dirección de la respuesta depende del tóxico, tiempo de exposición y concentración del tóxico.

La concentración de hemoglobina se incrementó en un 10.32% y 40.34% a concentraciones de 0.01 y 0.1 ppm, de níquel. Utilizando la concentración más alta de 1.2 ppm del metal se encontró una inhibición del 4.19% de la concentración de hemoglobina (Ver gráfico No. 4, 7 y 8).

El incremento en las concentraciones de hemoglobina se deben probablemente a las funciones tóxicas del níquel tales como su habilidad para reemplazar otros iones metálicos divalentes en enzimas y proteínas (Scott, J.J; Fordsman. 1997). Lo que hace suponer que en ambientes bajos de oxígeno el Ni^{+2} reemplaza al átomo de hierro (Fe^{+2}) del grupo hem, originando con esto un incremento en la producción del ácido delta-aminolevulinico sintetasa y por consiguiente un aumento en los valores de hemoglobina..

Esto se debe a que la síntesis de hemoglobina es en parte controlada vía la ruta metabólica de síntesis del hem y la enzima que controla la tasa de síntesis del hem es la delta aminolevulinato sintetasa y a su vez la producción de ésta es regulada por la hormona, eritropoyetina y debido a que la concentración de oxígeno en sangre es determinante para la producción de esta hormona, se afecta la producción del ácido delta aminolevulinico sintetasa y por lo tanto la concentración de hemoglobina (Michiyori, Kobayashi; Toru, Neza. 1986; Shanker, y su grupo 1979).

Estos resultados de incremento en las concentraciones de hemoglobina coinciden con lo reportado por Shanker, J y su grupo (1979) quien después de exponer al teleostero *Colisa fasciatus* a 45 ppm de Sulfato de Níquel encuentra efectos

hematológicos tales como policitemia; (incremento en los valores de hematocrito, de glóbulos rojos y hemoglobina) y leucopenia (reducción en el número de leucocitos y linfocitos.)

Los resultados obtenidos experimentalmente y los reportados sugieren que la eritrocitosis (valores altos de hemoglobina), pueden ser usados en monitoreos presuntivos de toxicidad de níquel en organismos acuáticos.

La inhibición de hemoglobina del 4.19% a la mayor concentración del níquel 1.2 ppm. Puede ser porque a concentraciones mayores el níquel afecta la bicapa lipídica de las membranas de los eritrocitos, así como la síntesis de proteínas de las membranas celulares lo que origina un decremento de la permeabilidad del agua a través de las membranas de los eritrocitos y por lo tanto un decremento en la tasa de éstos (*Tkeshelashvili y su grupo 1989*).

Diferentes organismos contienen el neurotransmisor acetilcolina (Ach), ya que su movimiento, alimentación y reproducción son funciones que dependen en gran parte del sistema nervioso, en el cual participa la Acetilcolina Ach es conocido por ser un neurotransmisor en sistema nervioso central de crustáceos.

En este estudio se encontró que a concentraciones de 0.01 y 0.1 ppm el níquel estimuló la actividad de la acetilcolinesterasa (AchE o Achasa) en *Moina macrocopa* en un 11.90% y 26.19%. respectivamente y a concentraciones de 1.2 ppm se encontró una inhibición del 11.90% (ver gráfico No 5, 7 y 8).

En lo referente a estimulación de la actividad de la Achasa en *M. macrocopa*, es probable que el níquel interactue en el sitio alostérico de la enzima aumentando su actividad por su sustrato (Ach). Esto se apoya en lo descrito por Sanz; Repetto (1995) los cuales refieren activación de tipo alostérico en el caso de aluminio y otros iones metálicos. El modelo de regulación alostérica de la actividad

enzimática de la AchE, reportado por los mismos autores postulan la existencia de tres lugares aniónicos: α , lugar aniónico catalítico, β y γ periféricos, siendo el β específicamente acelerador.

Los agentes estimulantes de AchE provocan un bloqueo de la transmisión colinérgica.

En otra investigación realizada por Kufcsak y su grupo (1994) encontró que después de exponer las partes del intestino de carpa a 5 mg/L de CuSO_4 , se incrementa la actividad de la AchE.

Así en la intoxicación aguda con Al^{+3} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Sn^{+2} , Hg^{+2} , acetato amónico y vanadato, estos elevan la actividad colinesterásica, sin embargo con el cloruro mercúrico en administración repetida tras una estimulación inicial, aparece una disminución de la actividad (Repetto, M. 1995).

También se ha observado en humanos y comprobado experimentalmente en ratas, que ante una primera exposición a dosis bajas de determinados organofosforados (por ejemplo, etilparation), las colinesterasas sufren un incremento inicial antes de manifestarse la inhibición. Este fenómeno es más común en la acetilcolinesterasa que en la colinesterasa (Sànz, y su grupo 1991).

Los resultados obtenidos demuestran que a 1.2 ppm concentración más alta de níquel empleada. Se encontró inhibición de la velocidad de hidrólisis de la AchE.

Puede suceder que a concentraciones más altas la unión del níquel a la enzima reduce su afinidad por su sustrato. La inhibición en general depende de la dosis.

Además existen otros agentes neurotóxicos que son inhibidores más o menos potentes de las colinesterasas tales como sodio, cinc, cobre, plomo, el mercurio tanto metálico, en forma de vapor, de cloruro o el metilmercurio (Repetto, M. 1995).

Estudios realizados por Aziz, y su grupo (1993) en tilapia mossambica, expuesta a dosis de cloruro de cadmio de (10 $\mu\text{g}/15\text{ L}$) durante 2 días mostró un decremento en la actividad de la acetilcolinesterasa.

En otra investigación realizada por Reddy, S.L.; Venugopal N.B. 1993, se estudio el efecto tóxico in vivo de cloruro de cadmio (0.6 ppm) sobre el cangrejo de agua dulce comestible (*Barutelphusa guerini*) en un lapso de 15 días, el consumo de oxígeno disminuyó y la actividad de la AchE se inhibió en todos los tejidos.

Los resultados obtenidos anteriormente coinciden con los reportados por Carson, B y su grupo (1991), quien refiere que el níquel ejerce una variedad de efectos sobre las enzimas debido a que puede substituir otros iones metálicos divalentes, por lo que es capaz de inhibir y activar la misma enzima dependiendo de su concentración.

Es importante notar, que los resultados obtenidos anteriormente de los distintos parámetros bioquímicos de *Moina macrocopa* indican que es posible observar un efecto significativo en el incremento de la toxicidad al utilizar concentraciones de 0.1 y 1.2 ppm de níquel.

Hasta ahora solo hemos analizado parámetros que pueden influenciar la disponibilidad del níquel, así como su efecto tóxico sobre el metabolismo de *Moina macrocopa*. En adelante analizaremos las concentraciones de metales y la relación que guardan con los parámetros antes citados.

Por lo que respecta a la concentración de níquel, encontrada en fase acuosa y sedimento a las 24 y 48 horas que se muestran en la gráficos No. 9,10,11 y 12, se puede observar que cambian ligeramente con respecto al tiempo. Para la fase acuosa a las 24 horas se encontró un porcentaje del metal del 2.74 % y a las 48

horas del 3.73 %. Por otra parte en sedimento a las 24 horas se encontró un porcentaje del 94.86 %, mientras que a las 48 horas del 92.84 %.

En estos datos observamos que la mayor parte del metal tiende acumularse en el sedimento, debido a la afinidad que tiene por las arcillas y materia orgánica pero conforme avanza el tiempo tiende a liberarse ligeramente a la fase acuosa y disminuir en el sedimento.

Esto puede deberse a que los metales como el níquel que se unen a carbonatos, arcillas y materia orgánica son mucho más biodisponibles que aquellos metales que se unen a otros compuestos del sedimento tales como los óxidos de fierro y sulfuros (*Lacerda, D.L. y su grupo 1992*).

Cabe mencionar que se obtuvieron estos valores de concentraciones del metal en fase acuosa y sedimento a las 24 y 48 horas porque se requirieron bioensayos por sextuplicado a diferentes concentraciones para determinar la CL_{50} en agua y sedimento por lo que se aprovecho para obtener estos datos.

En los bioensayos los rangos de concentración del tóxico que se consideraron fueron; 0.01, 0.1 y 1.2 ppm, teóricamente el valor mínimo es reportado en la literatura como limite máximo permisible para sistemas de agua dulce, un valor intermedio y el valor máximo que fue la décima parte de la CL_{50} .

En general del metal extraído de los sistemas agua-sedimento a las 48 horas de exposición a concentraciones subletales, se encontró un 94.69 % de este en sedimento, siendo 0.0094, 0.095 y 1.141 ppm, las concentraciones detectadas y para la fase acuosa el porcentaje encontrado fué de 3.77% y las concentraciones fueron 0.00043, 0.0042 y 0.034 ppm (ver gráfico No. 13).

Analizando estos resultados vemos que en general sucede lo mismo que con las concentraciones detectadas en agua y sedimento que se utilizaron para determinar la CL_{50} y que se reportaron anteriormente.

La tendencia del níquel es la de acumularse en el sedimento debido a las características físicas y químicas de este, tales como valores altos de conductividad, materia orgánica y capacidad de intercambio catiónico. Además es necesario resaltar que la concentración del níquel en la fase acuosa o en el sedimento desde el punto de vista químico depende del pH del sedimento, ya que en gran medida determina el comportamiento de los parámetros como son conductividad eléctrica, cationes, aniones, así como metales pesados, el aumento o la disminución de pH en una unidad o menos ayuda a liberar o precipitar ciertos metales quedando disponibles para los organismos que habitan en el.

Otro de los factores que influyen en la disponibilidad del níquel, son los componentes inorgánicos y orgánicos del sedimento. Dentro de los inorgánicos se encuentran los aluminosilicatos (arcillas), la característica de éstas es su habilidad para absorber iones metálicos debido a su cubierta exterior de grupos hidroxilo.

También la superficie de las arcillas puede cargarse negativamente, proporcionando sitios de adsorción para iones metálicos.

Por otro lado el espacio entre las capas de las arcillas es un lugar donde los iones de los metales pueden residir. La incorporación de metales pesados dentro de los minerales detritales y arcillas se presenta por reemplazamiento de los iones por un metal, ejemplo: Pb^{+2} y Ni^{+2} que reemplazan a K^+ , Ca^{+2} o Na^+ . Otra de las características de las arcillas es su habilidad para expanderse lo que hace que incrementen su superficie de área y de esta forma puedan acumularse los metales pesados.

Otro de los componentes que influyen en la biodisponibilidad son los componentes orgánicos, los cuales son un factor determinante en la disponibilidad de los metales pesados en sedimentos. Estos participan en la solubilización de especies metálicas por complejación con estas (Ferguson, J. 1990).

En este trabajo podemos observar que el níquel está biodisponible para el organismo *Moina macrocopa*, ya que se observaron efectos subletales a las concentraciones empleadas, esto nos dice que la movilización de los metales pesados puede también ser en suelos neutros o alcalinos, que contienen arcilla y altas concentraciones de materia orgánica, debido al predominio de los procesos de absorción y desorción, provocando que los metales pesados formen aniones complejos, fácilmente solubles.

La fracción biodisponible es la que se encuentra más débilmente ligada a otros compuestos, por lo tanto, esta fracción es la que está más fácilmente disponible para los organismos acuáticos.

Además organismos como *Moina macrocopa* pasan gran parte de su tiempo alimentándose sobre la superficie del sedimento. Son filtradores no selectivos que en condiciones naturales, se alimentan de fitoplanctón, bacterias, materia orgánica e ingieren partículas de sedimento menores de $0.5 \mu\text{m}$ ya sea que estén suspendidas o sedimentadas (Nebeker y su grupo. 1984; Gerrisen J y su grupo 1982).

X. CONCLUSIONES

Ante la problemática que presenta el amplio uso de metales pesados, se ha hecho indispensable el generar información para conocer el efecto que producen estos sobre los organismos acuáticos, por lo anterior es importante realizar trabajos experimentales.

Dentro de estos trabajos se encuentran los bioensayos con sedimentos que son una metodología útil para la valoración tóxica de metales sobre las comunidades acuáticas, de esta manera se expresa la respuesta que presentan los organismos a determinadas sustancias y concentraciones.

Al termino de este trabajo se cumplieron los objetivos inicialmente planteados.

1. Se preparó un sedimento artificial para sistemas de agua dulce, el cual en evaluaciones de toxicidad posee varias ventajas sobre un sedimento natural; son estandarizados, reproducibles, independientes de la variación estacional, se encuentran libres de contaminantes y permiten manipulación experimental.
2. Se evaluaron algunos parámetros físicos y químicos que nos ayudaron a determinar la disponibilidad del níquel en sedimentos.
3. El níquel es tóxico en *Moina macrocopa* ya que sus valores de CL_{50} -48 horas están en el intervalo de 6 - 12 ppm de acuerdo a lo establecido por SARH (1980). Los valores de las concentraciones letales (CL_{50s}), son indicadores muy útiles de la toxicidad aguda de las sustancias probadas bajo las condiciones experimentales.
4. El efecto tóxico que produce el níquel sobre las proteínas, hemoglobina y actividad enzimática de la acetilcolinesterasa de *Moina macrocopa*, es significativo aun a concentraciones que se consideran seguras para los hidrobiontes ya que el níquel a concentraciones de 0.01 y 0.1 ppm origina un aumento en todos los

parámetros antes mencionados. y a concentraciones de 1.2 ppm disminuye la concentración de proteínas, hemoglobina y actividad enzimática de la acetilcolinesterasa.

Por lo tanto la observación de dichas concentraciones pueden dar como resultado una alteración en el metabolismo y como consecuencia disminución en la producción de este organismo que es la principal fuente de nutrientes entre los productores primarios y los niveles tróficos superiores.

Los efectos estimulantes e inhibitorios sobre la concentración de proteínas, hemoglobina y actividad de la acetilcolinesterasa de *Moina macrocopa* fueron significativos y constantes en las concentraciones respectivas de níquel utilizadas, por lo que se pueden emplear como indicadores sensibles de la toxicidad de este metal en diversos cuerpos de agua.

5. El 94.69% del níquel tiende a acumularse en el sedimento y el 3.77% se encuentra en la fase acuosa.

6. El níquel se asocia a las arcillas y materia orgánica. Lo que permite mayor intercambio del metal entre el sedimento y fase acuosa.

7. Los resultados obtenidos indican que la acumulación del níquel, se restringe a una capa en la parte superior del sedimento con diferentes y relativamente bajos grados de biodisponibilidad. Por lo que se observaron efectos subletales sobre *Moina macrocopa* a las concentraciones empleadas.

8. El análisis estadístico aplicado hace evidente la existencia de diferencia estadísticamente significativa, cuando se comparan las medias globales de proteínas, hemoglobina, actividad de la acetilcolinesterasa, en cada una de las concentraciones del metal empleadas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran que existen diferencias significativas entre los valores medios globales de la concentración de níquel en fase acuosa y sedimento en cada una de las concentraciones empleadas.

9. Las pruebas de toxicidad de bioensayos con sedimentos rígidamente controlados forman la base para la determinación de las concentraciones permisibles o niveles seguros de los contaminantes.

XI. SUGERENCIAS

Es aconsejable que los sedimentos sean perfectamente caracterizados, con la finalidad de realizar una amplia correlación de los parámetros físicos y químicos con el efecto tóxico.

Se requiere sostener una búsqueda constante de la evaluación de la toxicidad de otros elementos químicos, debido a que muchos son los metales pesados que comúnmente, de alguna u otra manera contribuyen al deterioro ambiental y también muchas son las formas de vida que se ven afectadas por la presencia de estos contaminantes. Además de que éstos y sus productos de degradación, son tóxicos aún cuando se encuentran presentes a niveles de trazas y únicamente se dispone información mínima sobre toxicidad del 20% de estos.

Debido a que las pruebas de toxicidad utilizadas, son sensibles, simples, confiables, sencillas, rápidas y de bajo costo, y pueden realizarse con un equipo rutinario de laboratorio como es el espectrofotómetro. Se sugiere utilizar estas pruebas como medio para evaluar la calidad del agua de diferentes cuerpos acuáticos empleando, la estimulación e inhibición de proteínas, hemoglobina y actividad de la acetilcolinesterasa como parámetros bioindicadores.

XII. ANEXO

ANEXO 1

XII.1. GLOSARIO

Agua de poro (agua intersticial): Es el agua que ocupa los espacios entre las partículas del sedimento y puede ser removido del sedimento total por filtración a vacío/presión, centrifugación o compresión.

Antropogénicos: Son los cambios en el medio ambiente producidos por el hombre

Biodisponibilidad: Un contaminante o químico sembrado en el sedimento es biodisponible; si se presenta en una forma o fase, la cual causa una respuesta biológica en una o más de las especies, con las cuales ha llegado a estar en contacto.

Bioensayo: Es un experimento, en el cual de forma particular organismos acuáticos son expuestos en el laboratorio a muestras de sedimento de campo (o extractante de éste), el cual contiene potencialmente uno o más contaminantes con la intención de medir posibles efectos biológicos de éstos.

CL₅₀ : Es la concentración de un contaminante en la cual provoca el cincuenta por ciento de las muertes en una población cuando éste es expuesto intencionalmente.

Contaminante: Toda materia o energía en cualesquiera de sus estados físicos y formas que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua y suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altera o modifica su composición y/o condición natural.

Dosis: Cantidad de sustancia tóxica que entra al organismo.

Macrofauna: Animales cuyo tamaño es medido en centímetros más que en unidades microscópicas.

Mesofauna: Animales de tamaño de 200 μm a 1cm

Microfauna: Animales cuyo tamaño es menor a 200 μm , tales como los protozoarios, solamente visibles bajo el microscopio.

Microflora: Los microorganismos (bacterias, hongos y algas unicelulares), que viven en un organismo, hábitat particular o en un ecosistema.

Pruebas de toxicidad: Es un experimento, en el cual de forma particular los organismos acuáticos son expuestos en el laboratorio a un sedimento natural limpio o artificial, el cual ha sido sembrado en el laboratorio con un químico ó mezcla de químicos conocidos; generalmente a un rango de concentraciones.

Respuesta: El efecto de la medida biológica del material probado. En pruebas de toxicidad aguda usualmente es la muerte, en pruebas de bioestimulación es el incremento de biomasa.

Sedimento de referencia: Es un sedimento total no contaminado que representa al sedimento de prueba (contaminado) en todas sus características posibles. Es usado en un bioensayo para determinar las respuestas del organismo de prueba en el sedimento en la ausencia de el o los contaminantes de interés.

Sedimento total: Es el sedimento + agua de poro

Toxicidad aguda: Los efectos adversos totales producidos por una sustancia tóxica cuando se administra en forma de dosis única.

Toxicidad subletal: Tiene efectos deteriorantes pero no causa muerte

Tóxico: Cualquier sustancia (pura o combinada) o efluente que al entrar en contacto con el organismo produzca daños estructurales, alteraciones bioquímicas o fisiológicas o incluso la muerte, dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición.

ANEXO. 2

XII.2. Características generales de *Moina macrocopa* (pulga acuática)

Los cladóceros son un grupo abundante y de gran importancia en la naturaleza, en los ecosistemas acuáticos son la principal fuente de nutrientes entre los productores primarios y los niveles tróficos superiores. En el estomago de peces se han reportado contenidos de 1 a 95% de cladóceros por volumen

Estos organismos son planctónicos; sin embargo, en ensayos de sedimentos, pasan gran parte de su tiempo alimentándose sobre la superficie del sedimento. Son filtradores no selectivos, que en condiciones naturales, se alimentan de fitoplanctón, bacterias, materia orgánica e ingieren partículas de sedimento menores de 0.5 μm , ya sea que estén suspendidas o sedimentadas. A su vez éstos organismos son depredados por especies carnívoras como peces y zooplantófagos (*Gutiérrez, V.A. 1990; Nebeker y su grupo 1984; Gerritsen, J; Porter, K.G. 1982*)

Nombre científico	<i>Moina macrocopa</i>
Phylum:	Artropoda
Clase:	Crustácea
Orden:	Cladóceras

Miden aproximadamente de 0.2 a 0.7 mm, su cuerpo es de forma oval, comprimido, no está perfectamente segmentado y sólo se diferencian dos partes: Cabeza y tronco, ver figura 1.

La cabeza esta constituida por 5 pares de apéndices; un ojo compuesto y un ojo nauplio. El primer par lo constituyen las antenas que poseen quimiorreceptores y surgen del margen ventral de la cabeza, marcan el dimorfismo sexual, ya que en los machos son grandes y curvas, con ella sujetan a la hembra durante la cópula, en tanto en está última son cortas y rectas. El segundo par de apéndices esta constituido por las antenas, son estructuras grandes, articuladas y móviles que se

insertan a cada lado de la cabeza, actúan como el principal órgano de locomoción, cuando las antenas presentan movimientos descendentes el crustáceo se desplaza rápidamente, mientras que con movimientos ascendentes se desplaza lentamente. El tercer, cuarto y quinto pares de apéndices se encuentran transformados como estructuras bucales. Detrás de la cabeza y continuándola se extiende el caparazón que encierra el tronco y que también es transparente y quitinoso.

La boca es pequeña, se localiza cerca de la unión del tronco y la cabeza, está formada por diminutas mandíbulas romas seguidas de dos pares de maxilas y apéndices birrámeos aplanados que utiliza para respirar y filtrar partículas de alimento procedente de los sistemas acuáticos.

Las hembras poseen ovarios pareados cerca del intestino medio; los huevos partenogénicos son puestos mediante conductos que se abren dorsalmente en una bolsa de incubación entre la parte posterior del cuerpo y el caparazón, los huevos permanecen ahí hasta que se convierten en pequeños organismos parecidos a sus progenitores (*Ville. 1985*).

Los machos se pueden distinguir porque son de menor tamaño que las hembras, usualmente un tercio del tamaño de éstas sus anténulas son más largas, por lo tanto el movimiento es más rápido, presentan modificaciones postabdominales y los apéndices anteriores ostentan un gancho utilizado en la cópula (*Ivleva, I.V. 1989*).

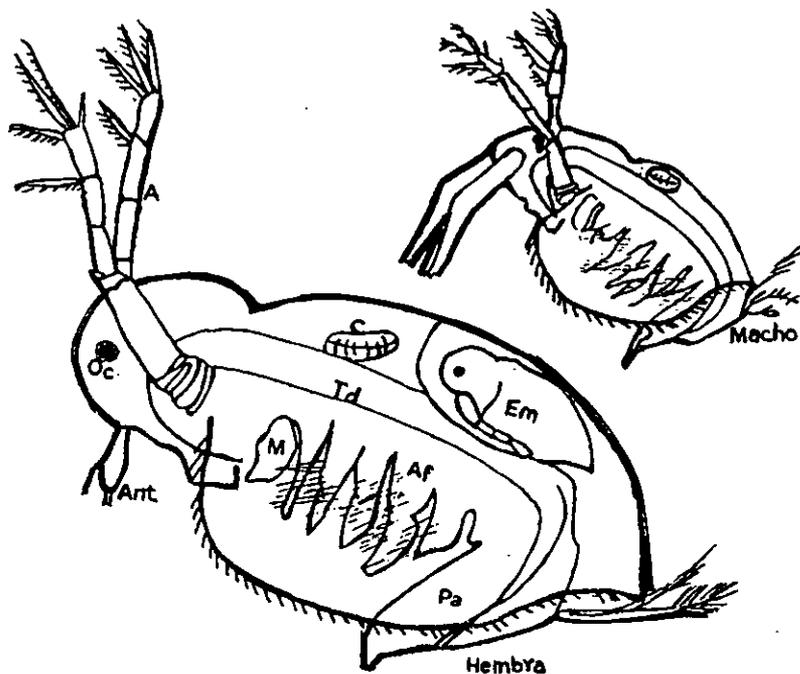
Reproducción.- Los cladóceros presentan dos tipos de reproducción , la sexual se lleva acabo cuando las condiciones ambientales son adversas, es decir que existe una alta densidad de población, acumulación de los productos de desecho y bajas temperaturas, estas condiciones favorecen las condiciones de los machos y aparición de huevos sexuales en envoltorios llamados "efipios".

La reproducción asexual es la más frecuente durante el ciclo de vida de los cladóceros, debido a que las poblaciones están principalmente constituidas por hembras, las cuales se reproducen por partenogénesis ocurre en condiciones ambientales óptimas (Martínez, J.F.; Gutiérrez, V.A. 1991 ; Ivleva, I.V. 1989).

Este crustáceo se encuentra en lagos, ríos, cuerpos de agua con vegetación y alcanza grandes densidades poblacionales en lugares con alto contenido de materia orgánica, soportando un amplio intervalo de temperatura (de 5 a 30°C).

En la mayor parte de los ensayos de sedimentos con cladóceros se ha medido toxicidad aguda, en una proporción sedimento agua 1:4, durante 48 horas.

Moina macrocopa (pulga acuática)



Af APÉNDICE FILTRADOR
C CORAZÓN
Em EMBRIÓN
Td TUBO DIGESTIVO
Pa POSTABDOMEN
Oc OJO COMPUESTO

A ANTENA
Ant ANTENULA
M MANDÍBULA

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Figura 2 . *Moina macrocopa*

ANEXO 3

XII.3.Preparación de Curvas de Calibración

XII.3.1. Preparación de la curva de calibración para proteínas empleando el método de Bradford.

Reactivos:

1) Solución de Bradford.- Pesar 100 mg de Azul de Comasie, disolver en 50 mL de etanol al 96%; agregar 100 mL de ácido fosfórico al 85% y aforar a un volumen total de 1000 mL con agua desionizada.

2) Solución madre de albúmina.- Pesar 50 mg de albúmina serica bovina, disolver y aforar a 50 mL con agua desionizada

Utilizar como blanco la solución de Bradford.

Curva de calibración de proteínas

Preparar a partir de una solución madre de albúmina serica bovina de (1000µg/mL)

Tabla No.8

Solución de albúmina concentración	Solución de albúmina (µL) alicuota de cada solución	Reactivo de Bradford
Tubo 1 [300 µg/mL]	100 µL	5 mL
Tubo 2.. [400 µg/mL]	100 µL	5 mL
Tubo 3 . [500 µg/mL]	100 µL	5 mL
Tubo 4 . [700 µg/mL]	100 µL	5 mL
Tubo 5 . [1000 µg/mL]	100 µL	5 mL

Dejar reposar 5 minutos y determinar absorbancia a 595 nm.

XII.3.2. Curva de calibración de proteínas

Tabla No. 9

μg proteína	Absorbancia
28.0090	0.188
38.6549	0.258
52.9508	0.352
72.4175	0.480
97.9676	0.648

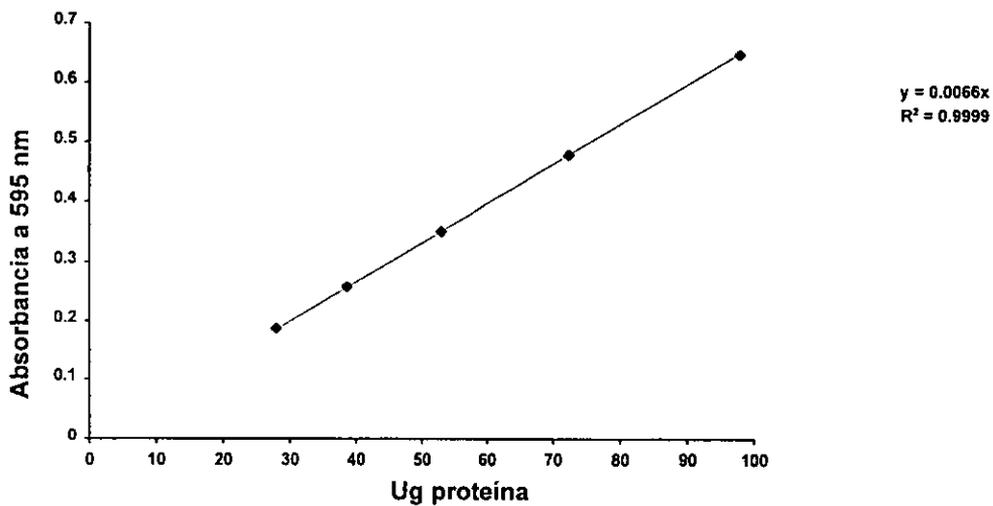


Gráfico No. 14

XII.3.2. Preparación de la Curva de calibración para hemoglobina

Partir de una solución patrón de Cianuro de Hemoglobina, 2 kits de cuatro ampollitas, cada ampollita contiene 5 mL de solución de cianuro de hemoglobina con las siguientes concentraciones.

- 1.- 27.4 mg/100 mL
- 2.- 59.6 mg/100 mL
- 3.- 79.1 mg/100 mL
- 4.- 232.0 mg/100 mL

Reactivo de Drabkin.- Pesar 1 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), 0.05 g de cianuro de potasio (KCN) y 0.2 g de ferricianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$). Adicionar cada uno de estos reactivos en un matraz volumétrico de 1000 mL, agitar y aforar a 1000 mL con agua desionizada.

Procedimiento.- De las 4 ampollitas de Cianuro de Hemoglobina soluciones patrón, tomar la cantidad correspondiente de acuerdo a la tabla No. 9. Adicionar el reactivo de Drabkins para realizar la dilución y llegar a la concentración de cianometahemoglobina ver tabla No. 10.

Determinar la absorbancia de los 10 tubos por triplicado a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro Varian DMS '90.

Utilizar como blanco el reactivo de Drabkin.

Tabla No. 10 Tabla de Procedimiento solución problema concentración

Tubo No.	Ampolletas con la solución de cianuro de hemoglobina (mg/100 mL)	Solución patrón mL	Reactivo de Drabkin mL	Cianuro de hemoglobina (mg/100 mL)	Hemoglobina g/100 mL
1	232	3	3	116	29.1
2	232	2	3	92.8	23.3
3	79.1	5	0	79.1	19.8
4	79.1	4	1	63.3	15.9
5	232	1	4	46.4	11.6
6	59.6	4	2	39.7	10.0
7	59.6	3	3	29.8	7.5
8	27.4	4	2	18.3	4.6
9	27.4	2	3	11.0	2.8
10	27.4	1	4	5.5	1.4

Mezclar y Dejar reposar 20 minutos

Determinar absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro

XII.3.4 Curva de calibración de hemoglobina

Tabla No. 11

Hemoglobina mg/mL	Absorbancia
0.069	0.035
0.139	0.070
0.275	0.122
0.450	0.199
0.580	0.265
0.600	0.300
0.794	0.420
0.99	0.526
1.165	0.619
1.746	0.780

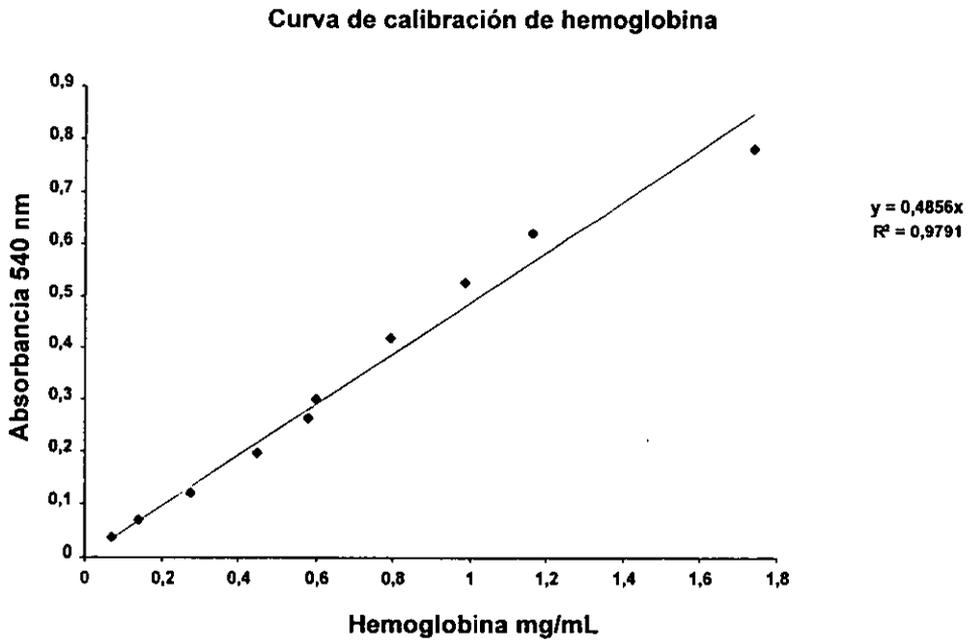


Gráfico No. 15

XII.3.5. Preparación de la Curva de calibración para acetilcolinesterasa

Blanco: En un tubo de ensaye agregar 3 mL de solución Tris pH =7, 2 mL de solución de hidroxilamina alcalina, 1 mL de ácido clorhídrico 4N y 1 mL de solución de cloruro férrico.

Realizar la curva de calibración de la siguiente manera

Emplear 2 mL de solución amortiguadora de Tris pH =7, a la cual se le adiciona 1 mL de solución acuosa estándar, de cloruro de acetilcolina, a concentraciones de 3.5, 7.0, 10.52, 14.03 y 17.54 $\mu\text{M}/\text{mL}$ respectivamente, en seguida agregar 2 mL de la mezcla de hidroxilamina alcalina, 1 mL de HCl 4N y 1 mL de FeCl_3 . Determinar la absorbancia a 540 nm.

XII.3.6. Curva de calibración de acetilcolina

Tabla No. 12

μM de acetilcolina	Absorbancia
3.50	0.1354
7.017	0.2560
10.52	0.3762
14.03	0.4965
17.54	0.6169

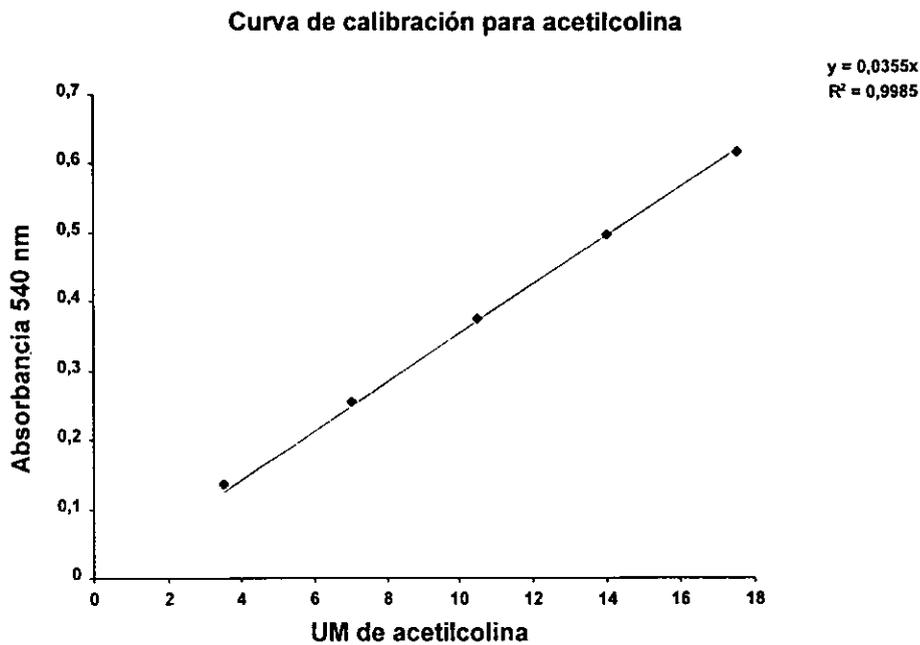


Gráfico No. 16

XII.3.7. Preparación de la curva de calibración de níquel (Para Absorción Atómica)

Preparación.- Pesar 0.4476 g de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (reactivo analítico Sigma), equivalente a (0.1 g de Ni, transferir a un matraz volumétrico de 1000 mL, adicionar 10 mL de HNO_3 concentrado y diluir hasta aforo con agua desionizada. La concentración obtenida es de 100 μg Ni/mL. De la solución madre realizar diluciones a las siguientes concentraciones 0.3, 0.5, 1.0, 5 y 10 mg/L.

Obtener las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro de Absorción Atómica (EPA. 1986).

Tabla No. 13. Condiciones del espectrofotómetro para la determinación de níquel.

Elemento Ni
Lámpara de cátodo hueco de Ni
Longitud de onda: 232.0 nm
Gases de flama: Aire-acetileno
Corriente de la lámpara: 2 mA
Tipo de flama: Oxidante
Equipo Varian DMS'90 (EPA. 1986)

Con los resultados se estableció la curva estándar.

ANEXO. 4

XII.4. Análisis Estadístico

A los resultados obtenidos en las diferentes determinaciones bioquímicas, se les efectuó un análisis de varianza y la prueba de Tukey's (Wayne, W.D. 1996), con la finalidad de encontrar una posible diferencia estadísticamente significativa entre las medias globales.

De tal forma que al comparar los valores medios de las distintos parámetros bioquímicos de los 4 tratamientos con níquel, se encontró diferencia estadísticamente significativa.

Este análisis es mostrado en las tablas No. 14, 15, 16, 17, 18 y 19. De este modo se estableció el siguiente juego de hipótesis para cada determinación bioquímica; proteínas, hemoglobina y actividad de la Achasa, aclarando que el siguiente par de hipótesis funciona para los tres tipos de determinaciones bioquímicas mencionados y lo que se establece es sólo un ejemplo.

1) Hipótesis nula: No existe diferencia estadísticamente significativa entre los 4 tratamientos con respecto a los valores medios globales de proteínas.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

2) Hipótesis alterna: Si existe diferencia estadísticamente significativa entre los 4 tratamientos con respecto a los valores medios globales de proteínas (al menos un par de medias es diferente).

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$$

Con el criterio de rechazar H_0 si $F_{cal} \geq F$ tablas.

Los resultados del análisis de varianza mostraron, en todos los casos para cada determinación bioquímica, por separado; proteínas, hemoglobina y actividad de la acetilcolinesterasa. Tablas No. 14, 16 y 18 que F_{cal} es mayor a F_{tablas} , por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_a , es decir, se puede afirmar con un 95% de confianza que existe diferencia estadísticamente significativa entre los 4 tratamientos con respecto a los valores medios globales de cada una de las determinaciones bioquímicas.

Apartir de los resultados anteriores, se procedió a realizar una comparación entre las medias por separado de proteínas, hemoglobina y acetilcolinesterasa, realizando las comparaciones simultáneamente mediante la prueba de Tukey's la cual corroboró lo establecido en el análisis de varianza (existen diferencias significativas entre los 4 tratamientos con respecto a los valores medios globales de cada una de las determinaciones bioquímicas). Tablas No. 15, 17 y 19. Para realizar esta prueba se controló un error experimental proporcional de tipo 1, nivel de significancia $\alpha = 0.05$, intervalo de confianza = 0.95.

Tabla No. 14. Análisis de varianza de la determinación de proteínas totales del sobrenadante

Fuente	G.L	SC	MC	F
Tratamientos	3	102.635	34.211	277.243
Error	32	3.950	0.1234	
Total	35	106.586		

 $\alpha=0.05$

Confianza = 0.95

Dado que $F = 277.243$ es mayor que $F_{0.95}$ para 3 y 32 g.l = 2.92, nos permite concluir que si hay diferencia estadísticamente significativa entre los 4 tratamientos con respecto a los valores medios globales de proteínas.

Tabla No. 15. Prueba de Tukey's Comparaciones simultáneas de la concentración media de proteínas totales del sobrenadante.

Comparación por mg/Kg de níquel adicionado	Hipótesis	Diferencia entre medias	Decisión estadística
Testigo-0.01	$H_0 = \mu_1 = \mu_2$	1.4399	Rechazar H_0 dado que $1.4399 > 0.4508$
Testigo-0.1	$H_0 = \mu_1 = \mu_3$	2.8593	Rechazar H_0 dado que $2.8593 > 0.4508$
Testigo-1.2	$H_0 = \mu_1 = \mu_4$	1.6964	Rechazar H_0 dado que $1.6964 > 0.4508$
0.01-0.1	$H_0 = \mu_2 = \mu_3$	1.4194	Rechazar H_0 dado que $1.4194 > 0.4508$
0.01-1.2	$H_0 = \mu_2 = \mu_4$	3.1363	Rechazar H_0 dado que $3.1363 > 0.4508$
0.1-1.2	$H_0 = \mu_3 = \mu_4$	4.5557	Rechazar H_0 dado que $4.5557 > 0.4508$

Grados de libertad (G.L) = 32

Varianza (MSE) $\sigma^2 = 0.1234$

Valor crítico del rango estudentizado = 3.85

Diferencia verdaderamente significativa (DVS) = 0.4508

Suma de cuadrados (SC)

Media de cuadrados (MC)

Tabla No. 16. Análisis de varianza de la determinación de hemoglobina del sobrenadante.

Fuente	G.L	S.C	M.C	F
Tratamientos	3	9.458	3.152	237.060
Error	32	0.426	0.013	
Total	35	9.885		

 $\alpha = 0.05$

confianza = 0.95

Dado que $F = 237.060$ es mayor que $F_{0.95}$ para 3 y 32 g.l = 2.92, nos permite concluir que si hay diferencia estadísticamente significativa entre los cuatro tratamientos con respecto a los valores medios globales de hemoglobina.

Tabla No. 17. Prueba de Tukeys's. Comparaciones simultáneas de la concentración media de hemoglobina del sobrenadante.

Comparación por mg/Kg de níquel adicionado	Hipótesis	Diferencia entre medias	Decisión estadística
Testigo-0.01	$H_0 = \mu_1 = \mu_2$	0.3032	Rechazar H_0 dado que $0.3032 > 0.1463$
Testigo-0.1	$H_0 = \mu_1 = \mu_3$	1.184	Rechazar H_0 dado que $1.184 > 0.1463$
Testigo-1.2	$H_0 = \mu_1 = \mu_4$	0.1527	Rechazar H_0 dado que $0.1527 > 0.1463$
0.01-0.1	$H_0 = \mu_2 = \mu_3$	0.8808	Rechazar H_0 dado que $0.8808 > 0.1463$
0.01-1.2	$H_0 = \mu_2 = \mu_4$	0.4259	Rechazar H_0 dado que $0.4259 > 0.1463$
0.1-1.2	$H_0 = \mu_3 = \mu_4$	1.3067	Rechazar H_0 dado que $1.3067 > 0.1463$

Grados de libertad (G.L) = 32

Varianza (MSE) $\sigma^2 = 0.013$

Valor crítico del rango estudentizado = 3.85

Diferencia verdaderamente significativa (DVS) = 0.1463.

Suma de cuadrados (SC)

Media de cuadrados (MC)

Tabla No. 18. Análisis de varianza de la determinación de la actividad enzimática de acetilcolinesterasa.

Fuente	G.L	SC	MC	F
Tratamientos	3	1.241 ϵ -03	4.137 ϵ -04	130.970
Error	32	1.010 ϵ -04	3.159 ϵ -06	
Total	35	1.342 ϵ -03		

 $\alpha = 0.05$

confianza = 0.95

Dado que $F = 130.97$ es mayor que $F_{0.95}$ para 3 y 32 g.l = 2.92, nos permite concluir que si hay diferencia estadísticamente significativa entre los 4 tratamientos con respecto a los valores medios globales de la actividad de acetilcolinesterasa.

Tabla No. 19. Prueba de Tukey's. Comparaciones simultáneas de la concentración media de la actividad de acetilcolinesterasa

Comparación por mg/Kg de níquel adicionado	Hipótesis	Diferencia entre medias	Decisión estadística
Testigo-0.01	$H_0 = \mu_1 = \mu_2$	5.1 ϵ -3	Rechazar H_0 dado que 5.1 ϵ -3 > 2.2809 ϵ -3
Testigo-0.1	$H_0 = \mu_1 = \mu_3$	0.01103	Rechazar H_0 dado que 0.01103 > 2.2809 ϵ -3
Testigo-1.2	$H_0 = \mu_1 = \mu_4$	4.8 ϵ -3	Rechazar H_0 dado que 4.8 ϵ -3 > 2.2809 ϵ -3
0.01-0.1	$H_0 = \mu_2 = \mu_3$	5.93 ϵ -3	Rechazar H_0 dado que 05.93 ϵ -3 > 2.2809 ϵ -3
0.01-1.2	$H_0 = \mu_2 = \mu_4$	9.9 ϵ -3	Rechazar H_0 dado que 9.9 ϵ -3 > 2.2809 ϵ -3
0.1-1.2	$H_0 = \mu_3 = \mu_4$	0.01583	Rechazar H_0 dado que 0.01583 > 2.2809 ϵ -3

Grados de libertad (G.L) = 32

Varianza (MSE) $\sigma^2 = 3.159 \epsilon$ -06

Valor crítico del rango estudentizado = 3.85

Diferencia verdaderamente significativa (DVS) = 2.2809 ϵ -3

Suma de cuadrados (SC)

Media de cuadrados (MC)

Una vez que se comprobó que hay diferencia estadísticamente significativa entre los 4 tratamientos con respecto a los valores medios globales de cada una de las determinaciones bioquímicas, se efectuó otro análisis de varianza y prueba de Tukey's para determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa al comparar por separado los niveles medios de níquel en sedimento y fase acuosa en los 4 tratamientos. Los resultados de dicho análisis con respecto a los valores medios de níquel en sedimento entre los 4 tratamientos fué estadísticamente significativa de igual manera que al comparar los valores medios de níquel en fase acuosa. Estos análisis son mostrados en las tablas No. 20, 21, 22 y 23.

De este modo se estableció el siguiente juego de hipótesis para la concentración de níquel en sedimento y fase acuosa, aclarando que el siguiente par de hipótesis funciona para las 2 fases antes mencionadas y lo que se establece es solo un ejemplo.

1) Hipótesis nula: No existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores medios globales de la concentración de níquel en sedimento en los 4 tratamientos.

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

2) Hipótesis alterna: Si existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores medios globales de la concentración de níquel en sedimentos en los 4 tratamientos, (al menos un par de medias es diferente)

$$H_a = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$$

Con el criterio de rechazar H_0 si $F_{cal} \geq F$ tablas.

Los resultados del análisis de varianza mostraron, en todos los casos para sedimento y fase acuosa, tablas No. 20 y 22 que F_{cal} es mayor a F tablas, por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_a , es decir, se puede afirmar con un 95% de confianza que existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores medios globales de la concentración de níquel en sedimento y fase acuosa en los 4 tratamientos.

Apartir de los resultados anteriores, se procedió a realizar una comparación entre las medias por separado de la concentración de níquel en sedimento y fase acuosa, realizando las comparaciones simultáneamente mediante la prueba de Tukey's la cual corroboró lo establecido en el análisis de varianza (existen diferencias significativas entre los valores medios globales de la concentración de níquel en sedimento y fase acuosa en los 4 tratamientos, (al menos un par de medias es diferente). tablas No. 21 y 23.

Para realizar esta prueba se controló un error experimental proporcional de tipo 1, nivel de significancia $\alpha = 0.05$, intervalo de confianza = 0.95.

Tabla No. 20. Análisis de varianza de la concentración de níquel en sedimento a las 48 horas de exposición a concentraciones subletales.

Fuente	G.L	SC	MC	F
Tratamientos	3	2.794670	0.931556	37076.8557
Error	8	2.01 ϵ -4	2.5125 ϵ -5	
Total	11	2.794871		

$\alpha = 0.05$

confianza = 0.95

Dado que $F = 37076.8557$ es mayor que $F_{0.95}$ para 3 y 8 g.l = 4.07, nos permite concluir que si hay diferencia estadísticamente significativa entre los valores medios globales de la concentración de níquel en sedimento en los 4 tratamientos.

Tabla No. 21. Prueba de Tukey's. Comparaciones simultáneas de los valores medios de la concentración de níquel en sedimento.

Comparación por mg/Kg de níquel adicionado	Hipótesis	Diferencia entre medias	Decisión estadística
Testigo-0.01	$H_0 = \mu_1 = \mu_2$	9.4 ϵ -3	No rechazar H_0 dado que 9.4ϵ -3 < 0.01310
Testigo-0.1	$H_0 = \mu_1 = \mu_3$	0.095	Rechazar H_0 dado que $0.095 > 0.01310$
Testigo-1.2	$H_0 = \mu_1 = \mu_4$	1.146	Rechazar H_0 dado que $1.146 > 0.01310$
0.01-0.1	$H_0 = \mu_2 = \mu_3$	0.0856	Rechazar H_0 dado que $0.0856 > 0.01310$
0.01-1.2	$H_0 = \mu_2 = \mu_4$	1.1366	Rechazar H_0 dado que $1.1366 > 0.01310$
0.1-1.2	$H_0 = \mu_3 = \mu_4$	1.051	Rechazar H_0 dado que $1.051 > 0.01310$

Grados de libertad (G.L) = 8

Varianza (MSE) $\sigma^2 = 2.5125 \epsilon$ -5

Valor crítico del rango estudentizado = 4.53

Diferencia verdaderamente significativa (DVS) = 0.01310

Suma de cuadrados (SC)

Media de cuadrados (MC)

Tabla No. 22. Análisis de varianza de la concentración de níquel en fase acuosa a las 48 horas de exposición a concentraciones subletales.

Fuente	G.L	SC	MC	F
Tratamientos	3	5.989576 ϵ -3	1.996525 ϵ -3	7227.2398
Error	8	2.21 ϵ -6	2.7625 ϵ -7	
Total	11	5.991786 ϵ -3		

 $\alpha = 0.05$

confianza = 0.95

Dado que $F = 7227.2398$ es mayor que $F_{0.95}$ para 3 y 8 g.l = 4.07, nos permite concluir que si hay diferencia estadísticamente significativa entre los valores medios globales de la concentración de níquel en fase acuosa en los 4 tratamientos.

Tabla No. 23. Prueba de Tukey's. Comparaciones simultáneas de los valores medios de la concentración de níquel en fase acuosa.

Comparación por mg/Kg de níquel adicionado	Hipótesis	Diferencia entre medias	Decisión estadística
Testigo-0.01	$H_0 = \mu_1 = \mu_2$	4.3 ϵ -4	No rechazar H_0 dado que 4.3ϵ -4 < 1.3746 ϵ -3
Testigo-0.1	$H_0 = \mu_1 = \mu_3$	4.2 ϵ -3	Rechazar H_0 dado que 4.2ϵ -3 > 1.3746 ϵ -3
Testigo-1.2	$H_0 = \mu_1 = \mu_4$	0.053	Rechazar H_0 dado que $0.053 > 1.3746 \epsilon$ -3
0.01-0.1	$H_0 = \mu_2 = \mu_3$	3.77 ϵ -3	Rechazar H_0 dado que 3.77ϵ -3 > 1.3746 ϵ -3
0.01-1.2	$H_0 = \mu_2 = \mu_4$	0.05257	Rechazar H_0 dado que $0.05257 > 1.3746 \epsilon$ -3
0.1-1.2	$H_0 = \mu_3 = \mu_4$	0.0488	Rechazar H_0 dado que $0.0488 > 1.3746 \epsilon$ -3

Grados de libertad (G.L) = 8

Varianza (MSE) $\sigma^2 = 2.7625 \epsilon$ -7

Valor crítico del rango estudentizado = 4.53

Diferencia verdaderamente significativa (DVS) = 1.3746 ϵ -3

Suma de cuadrados (SC)

Media de cuadrados (MC)

XII.5. ANEXO. 5

Tabla No. 24 Limites máximos permisibles para níquel en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

	Ríos		Embalses naturales y artificiales		Aguas Costeras	
Parámetro (mg/L)	Uso en riego agrícola, público urbano y protección de vida acuática		Uso en riego agrícola y público urbano		Explotación pesquera navegación y otros usos. Recreación y Estuarios	
	PM	PD	PM	PD	PM	PD
Níquel	2	4	2	4	2	4

P.D. = Promedio Diario
P.M. = Promedio Mensual

NORMA OFICIAL MEXICANA
NOM-001-ECOL-1996.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

A) Bibliografía Citada

- Aguilar, Santelises, A.; Etchevers, Barra, J.D.; Castellanos, Ramos, J.Z., (1987). "Análisis Químico para envaluar la fertilidad del suelo". Edit: Sociedad mexicana de la ciencia del suelo, México, p.85-91, 116-117.
- Anuario Estadístico de Pesca, (1990). Dirección General de Informática y Registros pesqueros. Secretaria de Pesca, México, D.F.
- Apha-Awwa-WpcF, (1992). "Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales" 17ª ed, Edit: Díaz de Santos, Madrid España, p.8-12-8-13.
- Aubert, H; Pinta, M, (1980). "Trace elements in soils", 2ª ed. Edit: Elsevier Scientific Publishing Company, New York, p.63-68.
- Aziz, F; Amin, M; Shakoori, A.R, (1993). "Toxic effects of cadmium chloride on the haematology of fish, *Tilapia massambica*" Zoological-Society-of-Pakistan, 13 : 141-154.
- Barret, K.L, (1995). "A comparison of the fate and effects of prochloraz in artificial and natural sediments" Journal of Aquatic Ecosystem Health, 4 : 239-248.
- Berman, E, (1980). "Toxic metals and their analysis" Edit: Heyden, London. Philadelphia, , p.171-176.
- Bradford, M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of dye-binding" Analytical Biochemistry 72 : 248-254.

Burden, J.A.; Aust, S.D. (1987). "Microsomal lipid peroxidation method in enzymology" **52**: 302-310.

Burton, G.A., Jr. (1992). "Sediment toxicity assessment" Edit: Lewis Publisher, Inc. Florida, p.3-11, 48, 67-73.

Calabrese, J.E.; Kenyon, M.E. (1991). "Air toxics and risk assessment" Edit: Lewis Publishers, p.463-471.

Carson, B.L.; Ellis, H.V.; Cann, J.L., (1991). "Toxicology and biological monitoring of metals in humans 3^a ed. Edit: Lewis Publishers, p.163-167.

Cepeda, Dovala, J.M. (1991) " Química de suelos" Edit: Trillas, Universidad Autónoma Agraria, México D.F, p.105-109.

Christoper, K.M.; Van, Hole, K.E. (1990) "Biochemistry" Edit: Publishing Company, Inc. California.

Colli, M.J. (1990). "Remoción de metales pesados y otros compuestos en un tipo de suelo del distrito de riego 03. Hgo. 1 er. simposio Nacional de degradación del suelo Abril. Inst. Geol. UNAM, p.50-51.

Crommentuijn, T.; Brils, J.; Van, Stralen, M. (1993). "Influence of cadmium on life-history characteristics of *Folsomia candida willen* in an artificial soil substrate" *Ecotoxicology and Environmental Safety* **26** : 216-227.

Culp, M.J.; Podemski, L.C.; Cash, J.K.; Lowell, B.R. (1996). "Utility of field-based artificial streams for assessing effluent effects on riverine ecosystems" *Journal of Aquatic Ecosystem Health* **5**: 117-124.

Duke, J.M. (1980). "Nickel in rocks and ores, in nickel in the Environment" ed: J.O. Nriagu, Edit: John Wiley & Sons, New York, p.27-50.

Dutka, B.J, (1988). "Priority setting of hazards in water and sediments by proposed ranking scheme and battery of tests approach" German J.Appl.Zool. 303-316.

E.P.A., (1986). "Health assessment for Nickel and Nickel compounds". final report. E.P.A 600/8-83-012FF.

Fergusson, E, (1990). "The heavy and elements chemistry environmental impact and health effects" Edit: Pergamon Press, New York U.S.A, p.243-277.

Ganong,M.D; William, (1984). "Fisiología Médica" 14^a ed, Edit: El Manual Moderno, México, D.F., p.569-572.

García, A, (1981). "Experimentos en microbiología del suelo" Edit: Continental, México D.F., p.14-15,22-27.

García, M.M, (1992). "Contaminantes tóxicos prioritarios en agua" Edit: Dirección de difusión cultural, Universidad Autónoma Chapingo, p.91-92.

Geoffrey, Mance, (1987) "Pollution threat of heavy metals in aquatic environments, Edit: Elsevier applied Science, New York, , p.9-13.

Gerritsen.J.; Porter,K.G, (1982). "The role of surface chemistry in filter feeding by zooplankton". Science **216** : 1225-1227.

Giesy,P.J; Graney,L.R, (1989). "Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators" Hidrobiología **188/189** : 21-60.

Gutiérrez, V.A, (1990). "Aspectos biológicos y algunas consideraciones sobre el cultivo en el laboratorio de *Moina macrocopa*. (crustácea : cladocera). Tesis profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; IPN; México. D.F.

Hausinger, P.R, (1993). "Biochemistry of nickel" vol.12, Edit: Plenum Press, New York, p. 1, 253-257.

Hestrin, S, (1949). "Reaction of Acetylcholine and other carboxylic acid derivates with hidroxilamine and its analitical aplication" J.Biol. Chem. **180** : 249-261.

Hickman,Roy; Thomann,V.R; Murdoch,D, (1988). "Manual de evaluación y manejo de sustancias tóxicas en aguas superficiales" ,sección 2, Welfare Canadá.

Hobart,H; Willard; Merrit,L.L; Dean,A.J; Settle,A.F, (1991). "Instrumental methods of analysis, 7ª ed. Edit: Iberoamericana, U.S.A., p.237-243.

Ivleva,I.V, (1973). "Mass cultivation of invertebrates biology and methods". Academy of sciences of the URSS. all Unión Hidrobiological Society and Israel program for cientific translations. Cap. *Daphnia*, p.79-120.

Jeffrey,D.W; Madden,B, (1993). "Bioindicators and environmental management" 2ª ed. Edit: Academic Press, San Diego C.A, p.401-409.

Kent,D; Henamara,P; Putt,A, (1994). "Octamethylcyclotetrasiloxane in aquatic sediments: toxicity and risk assessment" Ecotoxicology and enviromental Safety, **29** : 372-389.

Kufcsak,O; Szegletes,T; Lang,G; Halasy,K; Benedeczky,I. Nemcsok, J. (1994). "Effects of pesticides on molecular forms of AchE in alimentary canals of carp" Pestic. Biochem. Physiol., **49** (3) : 155-163.

Lacerda,D.L; Fernández,A.M; Calanzas,C.F; Tanizaki,F.K, (1992). "Bioavailability of heavy metals in sediments of two coastal lagoons in Rio de Janeiro, Brasil" Hidrobiología. **228** : 65-70.

Lars,Friberg; Nordberg,F.G; Vouk,B.V, (1990). "Handbook on the toxicology of metals" vol.2, 2ª ed. Edit: Elsevier, New York, p.462-478.

Lauwervs,R; Hoet,P, (1991). "Industrial Chemical exposure guidelines for Biological monitoring, 2ª ed. Edit: Lewis Publishers, , p.83-87.

Maciorowski,A.F; Little,L; Sims,J.L., (1980). "Biossays procedures and results " Literature review Journal Water Pollution. Control Federation, **52** (6) : 1630-1655.

Margalef, R, (1983). "Limnología" Edit: Omega, Barcelona, , p.919-920.

Martínez,J.F.; Gutiérrez,V.A, (1991). "Fecundity, reproduction and.growth of *Moina macrocopa* fed different algae". Hidrobiología **222** : 49-55.

Michiyori,Kobayashi; Toru,Nezu, (1986). "Variation of hemoglobin conten in *Daphnia magna*" Physiol.Zool. **59** (1): 35-42.

Migliore,L; Nicola,Giudici.M, (1990). "Toxicity of heavy metals to *Asellus aquaticus* (crustácea, isopoda)". Hidrobiología **203** : 155-164.

Minch, J.M, (1989). "Experiments in Biochemistry : projects and procedures" Edit: Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, p.45-46.

Moreno, Dahme.R, (1970). "Clasificaciones tentativas para materia orgánica y nitrógeno total" Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas , SARH. Departamento de suelos, México D.F.

Morton,Lippman; Ph.D; Rall,P.D, (1992). "Environmental toxicans; Human exposures and their health effects" New York, p.606-613.

Nebeker,A.V; Cairns,M.A; Gakstatter,J.H; Malueg,K.W; Schuytema,G.S; Krawczyk,D.F, (1984) "Biological methods for determining toxicity of contaminated fresh water sediments to invertebrates". Environ.Toxicol.Chem **3** : 617-630.

Nieboer,E; Nriagu,O.J, (1992) "Nickel and human health, vol.25, Edit: John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. p.587,603,629,659.

NOM-001-ECOL-(1996). Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca; "Norma Oficial Mexicana, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales y bienes nacionales. p.74.

NOM-074-ECOL (1994). Comité Consultivo Nacional de Normalización para la protección del ambiente.; "Proyecto de Norma Oficial Mexicana, que establece el método de prueba de toxicidad aguda con *Daphnia magna straus* (crustacea-cladocera). México, D.F. p.15.

OECD Organisation for the Economic Cooperation and Development, (1984). "Guidelines of the testing of chemicals", Guideline 207:Earthworm acute toxicity test OECD publications service. Paris, p.9.

Reddy,S.L.N; Venugopal,N.B.R.K, (1993). "Effect of cadmium on acetylcholinesterase activity and oxygen consumption in a fresh water field crab, *Barytelphusa guerini*" J.Environ.Biol 14 (3): 203-210.

Repetto, M, (1995). "Toxicología avanzada" Edit: Díaz de Santos, Madrid España, p.330-332.

S.E.T.A.C Society of Environmental Toxicology and Chemistry-Europa, (1993). "Guidance Document on Sediments toxicity test and Bioassays for freshwater and marine environments Workshop on Sediment toxicity assessment", Edit: Setac, Netherlands p.9-13. 22-24.

Sanz,P; Rodríguez,V.MC; Díaz,D; Repetto,J; Repetto,M, (1991). "Red blood cell and total blood acetylcholinesterase and plasma pseudocholesterase in humans : observed variances" Clin.Toxicol, 29 (1) : 81-90.

Schoor,P.W; Brausch,J, (1980). "The inhibition of acetylcholinesterase activity in pink shrimp *Penaeus durarom*. by methyl parathion and its oxon". Arch.Environ.Contam.Toxicol. 9 : 599-605.

Scoott, J.J; Fordsmand, (1997). "Toxicity of nickel to soil organisms in Denmark" *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **148**: 1-9.

Shanker, J.A; Anil, K.S; Chaudhry, H.S, (1979). "Haematological effects on nickel toxicity on a fresh water teleost, *Colisa fasciatus*" *Acta pharmacol, et toxicol.* **45** : 215-217.

Skoog, A; West, M; Homes, J, (1995). "Química Analítica" 6ª ed. Edit: Mc Graw-Hill. México D.F. p.453-467.

Stemmer, L.B; Burton, A.G.Jr; Sasson-Brickson, G, (1990). "Effect of sediment spatial variance and collection method on cladoceran toxicity and indigenous microbial activity determinations". *Environmental Toxicology and Chemistry.* **9** : 1035-1044.

Tkeshelashvili, L.K; Tsakadze, K.J; Khulusauri, O.V, (1989). "Effect of some nickel compounds on red blood cell characteristics" *Biol-Trace-Elem-Res*, **21** : 337-342.

Toporek, Milton, (1983). "Bioquímica" 2ª ed, Edit: Interamericana, México, D.F. p.256-261.

Vander, W.H; Welling, W, (1989). "Inhibition of acetylcholinesterase in guppies *Poecilia reticulata* by chlorpyrifos at sublethal concentrations : Methodological aspects". *Ecotoxicology and Environmental Safety* **17** : 205-215.

Vazquez, F; Sanchez, M; Alexander, H; Delgado, (1991). "Distribution of Ni, V and petroleum hydrocarbons in recent sediments from the Veracruz coast, México". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **46** : 774-781.

Ville, C.A., (1985). "Zoología" 3ª ed. Edit: Interamericana, México

Vizcaino, R, (1986). "La contaminación en México" Edit: Fondo de cultura económica, México.

Warren,A.L; Outridge,M.P; Zimmerman,P.A., (1995). "Geochemical partitioning and bioavailability of copper to aquatic plants in an artificial oxide-organic sediment" *Hidrobiología* **304** : 197-207.

Wayne, W.D, (1996). "Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud" 5ªed. Edit: Noriega , México D.F. p.345-370.

Wong, K.C, (1992). "Effects of chromium, copper, nickel and zinc on survival and feeding of the cladoceran *Moina macrocopa*" *Bull.Environ.Contam.Toxicol.* **49** : 593-599.

B) Bibliografía Consultada

Barnes, D.R, (1987). "Zoología de los invertebrados" 3ª ed. Edit: Nueva Interamericana, México, p.226, 307, 493.

Beutler,E.W; Allan,J; Erslew, Marshall.A; Lichtman, (1990). "Hematology" 4ª ed. Edit: Mc Graw-Hill, Inc. U.S.A. , p.377-387.

Brown, A.B. (1973). "Hematology principles and procedures" Edit: Lea Febiger, Philadelphia,. p.53-56.

Claybrook, D.L., (1983). "Nitrogen metabolism. in : L.H. Mantel. The biology of crustacea", vol. 5, Internal Anatomy and Physiological Regulation, Edit: Academic Press, New York, p.163-213.

Chapman,H.D; Pratt,P.F, (1991). "Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas. Edit: Trillas, México D.F. p.149-150.

Environmental Protection Agency, (1986). "Test methods for evaluating solid waste" vol. 1 A : Laboratory Manual physical/chemical methods, sw-846. U.S.A. Washington, p.7520-1-7520-3.

Willard, L.; Merrit, L. (1991). "Instrumental methods of Analysis" 7^a ed, Edit: Iberoamericana, U.S.A. p.237-247.