



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Efecto de la exposición crónica al cobre
sobre los parámetros demográficos de
dos especies de cladóceros:
un estudio generacional.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE :

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLOGICAS
(BIOLOGIA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A :

ELISA ARACELY PICAZO PAEZ

DIRECTORA DE TESIS : DRA. NANDINI SARMA

MEXICO, D. F.

MAYO 2006



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.

**En memoria de
SOLEDAD DIAZ MENDEZ**

Gracias por tu amor y por el lugar especial que me diste en tu vida

En medio del gran silencio que descendía ya sobre el lugar el cielo se teñía de violeta y púrpura.

Entonces comprendió la razón de su cansancio y de aquel frío que atenazaba su cuerpo, haciéndolo temblar como en invierno.

Su vestido era blanco aún, como el día en que naciera. Había recorrido las estaciones y los años sin manchar su hábito inmaculado; ahora podía irse, concluir bellamente su vida.

Nunca antes había encontrado acentos tan llenos de amor por la naturaleza, por la hermosura del cielo, del agua y de la tierra

Su canto dulcísimo se esparció por el aire, velado apenas de nostalgia, hasta que poco a poco se apagó, con la primera luz del horizonte.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Posgrado en Ciencias Biológicas

A DEGAPA, por la beca otorgada a través del proyecto “El uso del zooplancton para mejorar la calidad del agua. Estudio de caso del lago de Zumpango Estado de México” (IN234602) durante el periodo de enero a diciembre del 2004.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca N° 189412 otorgada de agosto del 2004 a julio del 2005

Agradecimiento especial a la Dra. Nandini Sarma por su dedicación al dirigir este trabajo y por su apoyo incondicional en todo momento.

Al Comité Tutorial conformado por la Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez, Dra. María del Rosario Sánchez Rodríguez, Dr. Javier Carmona Jiménez, Dr. Singaraju Sri Subrahmanya Sarma, por la revisión de este trabajo y sus valiosos comentarios en mejora del mismo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Zoología acuática de la FES Iztacala UNAM, por su apoyo y compañía.

DEDICATORIAS

A mi madre Dolores Paez Díaz dedico con todo mi amor este trabajo porque gracias a su apoyo he podido llegar a esta fase de mi vida. Gracias madre por tu ejemplo y dedicación.

A todos y cada uno de los integrantes de mi Familia que me han demostrado su cariño durante toda mi vida, a los nuevos integrantes y a los que ya no están físicamente conmigo, les dedico este trabajo que representa un gran logro para mí. Me siento muy orgullosa de todos ustedes y de pertenecer a una familia tan unida y llena de valores, muchas gracias por su apoyo y comprensión.

A mis amigos y compañeros que me han dado su aceptación llenando mi vida de alegría.

ÍNDICE

1. ABSTRACT	2
2. RESUMEN	3
3. INTRODUCCIÓN	4
4. ANTECEDENTES	10
5. JUSTIFICACIÓN	13
6. OBJETIVOS	14
7. MATERIALES Y MÉTODOS	15
7.1. Cultivo de cladóceros	15
7.2. Cultivo de microalgas	15
7.3. Preparación y análisis del tóxico	16
7.4. Ensayos de toxicidad aguda	16
7.5. Ensayos de toxicidad crónica	17
7.6. Análisis estadístico	19
8. RESULTADOS	20
8.1. Toxicidad aguda	20
8.2. Toxicidad crónica.	20
a. <i>Moina micrura</i>	20
b. <i>Ceriodaphnia dubia</i>	27
9. DISCUSION	34
10. CONCLUSIONES	40
11. ANEXO	41
12. BIBLIOGRAFÍA	43

1. ABSTRACT

Copper is one of the heavy metals frequently found in water bodies. Its impact across several generations can be easily evaluated in invertebrates. Such studies allow an analysis of the long term impact of the toxicant and its transfer from one generation to the next. Cladocerans are well suited for such studies since they are easy to culture under laboratory conditions, are parthenogenetic, have short generation time and high reproductive rates and are sensitive to toxicants. In this study the chronic impact of copper sulphate on the demographic parameters of successive generations of *Moina micrura* and *Ceriodaphnia dubia* was evaluated. The median lethal concentration (LC₅₀ 24h) was 0.35 mg/L of CuSO₄ for *M. micrura* while it was 0.66 mg/L CuSO₄ for *C. dubia*. On the other hand, the chronic toxicity tests showed that *M. micrura* was less sensitive; at CuSO₄ levels of 0.035 and 0.105 mg/L CuSO₄, a hormetic effect was observed on the life span and reproductive output of a more than 15% increase as compared to the controls. This hormesis was observed in the F1 but not F3 generation. In the case of *C. dubia*, the negative impact was observed only in the F3 generation. The results warrant further studies on the impact of toxicants on successive generations of zooplankton.

2. RESUMEN

El cobre es uno de los contaminantes más frecuentes de los cuerpos de agua, su impacto a concentraciones de toxicidad crónica en invertebrados puede ser evaluado a través de generaciones sucesivas de estos, siendo un diseño más realista que en una sola generación porque considera la exposición al tóxico durante la ovogénesis y embriogénesis y por ende la transferencia del tóxico de madres a neonatos. Para estas pruebas de toxicidad los cladóceros son una buena opción ya que son fáciles de cultivar en el laboratorio, tienen reproducción partenogenética, corto tiempo generacional y alta tasa de fecundidad, responden rápidamente a los cambios ambientales y son sensibles a los tóxicos. El objetivo de este estudio, fue evaluar el efecto de la exposición crónica generacional al cobre (CuSO_4) sobre los parámetros demográficos de los cladóceros *Moina micrura* y *Ceriodaphnia dubia*. Bajo condiciones experimentales, se registró una CL_{50} 24h de 0.35 mg/L de CuSO_4 para *M. micrura*, mientras que *C. dubia* fue más resistente en esta fase registrando una CL_{50} 24h de 0.66 mg/L CuSO_4 . Por el contrario, en la fase de toxicidad crónica, *M. micrura* fue la especie menos sensible ya que en la F1, las dos concentraciones presentaron una respuesta hormética en su tasa de crecimiento poblacional, incrementando un 17% respecto al control; sin embargo, en la F3, las dos concentraciones de cobre registraron una disminución del 26% en su tasa de crecimiento poblacional respecto al control. En el caso de *C. dubia*, solamente se presentó un impacto negativo de cobre en la F3, en la concentración más alta de tóxico disminuyendo su tasa de crecimiento poblacional en un 89% respecto al control. Ante estas perspectivas destaca la necesidad de evaluar el efecto crónico del cobre mediante generaciones sucesivas de organismos y conocer más ampliamente la sensibilidad del género *Moina* comparando su respuesta con la de organismos estándar, para su posterior manejo en evaluaciones toxicológicas.

3. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, los problemas de contaminación del agua se han venido incrementando y por ende recibiendo mayor atención tanto en los países industrializados como en los que están en desarrollo (Baduo, 1987). Los metales pesados son uno de los contaminantes más frecuentes (Walker *et al.*, 1998) y más peligrosos ya que no son biodegradables, sino que se transfirieren de uno a otro compartimiento permaneciendo en los sedimentos durante años, además de que progresivamente se van concentrando en niveles tróficos superiores presentando un efecto de magnificación (Moreno-Garrido *et al.*, 1999). Para el término "metales pesados", existen varias definiciones, de forma muy general se acepta que son elementos químicos con propiedades metaloides que presentan una densidad cinco veces mayor que el agua, sin contar los metales alcalinos, tierras alcalinas, lantánidos y actínidos (Abel 2000, Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999, Walker *et al.*, 1998, Manson, 1984).

Uno de los metales pesados que se encuentra con más frecuencia como contaminante de los sistemas acuáticos es el cobre (Rosales-Hoz y Carranza-Edwards, 1988). Este metal se encuentra en la corteza terrestre en diversas formas minerales, siendo las más frecuentes, la calcopirita (CuFeS_2), la calcocita (Cu_2S) y la bornita (Cu_5FeS_4). La meteorización de las formaciones rocosas y la actividad volcánica son originadoras de una presencia basal en las aguas naturales, registrando en los cuerpos de agua que se consideran libres de contaminación intervalos de 0.2 a 2 mg/L de cobre total (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999), siendo esta última concentración el límite permisible de cobre para el agua potable de México NOM-001-ECOL-1996; SEMARNAP y por ende, cuando se encuentra por arriba de esta concentración es considerado contaminante.

La presencia del cobre en los cuerpos de agua es incrementada por actividades humanas, como la minera, la manufactura de pinturas y aceites, el uso de pesticidas e insecticidas (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999, Hauri, 2001). En aguas residuales de México se han registrado niveles de hasta

6.40 mg/L de cobre, como resultado de las industrias, textil (Rico-Martínez, *et al.*, 1998) hulera, galvanoplástica, petroquímica secundaria (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999), así como por la corrosión de las tuberías domésticas de cobre debido al contacto prolongado que tienen con el agua (Villareal-Treviño, *et al.* 1986). El cobre en su forma CuSO_4 , es empleado como alguicida, siendo también una fuente de contaminación (Hauri, 2001).

Un efecto importante a considerar en los cuerpos de agua es la especiación del metal la cual puede modificar la toxicidad de este, debido a que se pueden modificar la bioabsorción. La especiación del cobre está determinada por la concentración total del cobre, el pH, la alcalinidad, el tipo y concentración de ligandos, la temperatura, el potencial redox y la dureza del agua (Hauri, 2001). El pH es uno de los principales determinantes de la especiación del cobre, principalmente porque compite por los ligandos aniónicos H^+ , un alto porcentaje del cobre no forma complejos a bajo pH prevaleciendo en su forma iónica libre siendo más tóxico a valores de pH menores a 6.5. La toxicidad del cobre disminuye cuando el pH incrementa debido a que el metal tiende a adsorberse sobre el material particulado y formar complejos con ligandos inorgánicos y orgánicos como el hidróxido, carbonato, entre otros ligandos, subsecuentemente hay reducción de los iones libres (Kim, *et al.*, 2001).

Cuando la alcalinidad del agua o cuando la dureza del agua se incrementa la toxicidad del cobre disminuye ya que los iones de este metal compite con los iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} reduciendo la entrada de cobre al organismo. La entrada pasiva de los iones metálicos a través de las membranas incrementa cuando la concentración de calcio disminuye libres (Kim, *op. cit.*). En los cuerpos de agua, la formación de complejos con el cobre esta dominada por ligandos orgánicos, principalmente con ácidos húmicos y ácidos flúvicos, los cuales tienen una alta estabilidad constante a bajas concentraciones, alto peso molecular compuestos derivados de la descomposición de la vegetación y caracterizados por un alto grado de aromaticidad. Los ligandos orgánicos generalmente tienen grupos O, N, o S, como grupo funcional. La formación de complejos con carbono orgánico generalmente disminuye la toxicidad del

cobre, aunque no siempre se elimina por completo (Smolyakov, *et al.*, 2004). En el caso de partículas de cobre asociadas con sedimentos suspendidos, hierro sólido y óxidos de manganeso generalmente son menos tóxicas que la fase disuelta dado que los organismos acuáticos tienen una baja exposición a metales pesados en partículas, puesto que estos se encuentran fuera de la columna de agua, así que la toxicidad es más predecida por el cobre en la columna de agua que en los sedimentos (Hauri, 2001).

Cabe destacar que el cobre, en niveles traza es un micronutriente esencial para la mayoría de los organismos vivos. Se conocen al menos 30 enzimas constituidas por cobre, incluyendo la citocromo oxidasa c y la oxido nitroso reductasa (Whitten, 1992). No obstante lo antedicho, cuando se excede la capacidad de control homeostático del cobre por parte del organismo, la exposición crónica a determinadas concentraciones de este, provoca efectos tóxicos. En organismos acuáticos como algas, bacterias, zooplancton y peces, el cobre es capaz de dañar las paredes y las membranas de las células, alterar los sitios activos de las enzimas e interactuar con los ácidos nucleicos (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999). En algas, puede inhibir la fotosíntesis y frenar la división celular pudiendo limitar su crecimiento. En cuerpos de agua en donde la luz y los nutrientes no son excesivos, pueden afectar la composición de especies del zooplancton (Hauri, 2001).

Ante estas perspectivas, estudios del efecto tóxico del cobre sobre el zooplancton permiten evaluar el efecto biológico adverso de este metal pesado, pudiendo identificar de que forma puede impactar en un ecosistema, valorar que cambios ecológicos tomaran lugar en estos sistemas y aportar elementos para poder generar normas, leyes y criterios de manejo de este y contaminante (Calow, 1998). Las pruebas a corto plazo (24, 48, horas etc.) como la Concentración Letal media (CL₅₀), son útiles para evaluar el impacto de la toxicidad aguda del cobre, determinando a cual concentración de tóxico se presenta un 50% de mortalidad de los organismos experimentados (APHA, *et al.*, 1998, Pesson P. 1979). Sin embargo, las tabla de vida del zooplancton, son una de las pruebas que aportan datos más realistas ya que evalúan el efecto de la exposición crónica a un tóxico, mostrando a nivel

poblacional el efecto acumulativo de bajas concentraciones de un tóxico. Para estas pruebas crónicas, generalmente se utiliza una fracción de la CL₅₀ de tóxico como concentración subletal (Sarma, 2000)

La mayoría de las pruebas de toxicidad crónica con zooplancton, inician con neonatos provenientes de madres que no fueron pre-expuestas al tóxico ignorando la exposición durante la ovogénesis y embriogénesis y por ende la transferencia del tóxico de madres a neonatos, de ahí que los estudios generacionales se apegan aun más a la realidad, mostrando el efecto de la exposición crónica a un tóxico que los organismos pueden tener en los cuerpos de agua contaminados (Van Leeuwen *et al.*, 1985)

Para las pruebas de toxicidad crónica, los estudios demográficos de tabla de vida son muy importantes para entender las estrategias de historias de vida del zooplancton sujetos a continuos cambios ambientales (Krebs, 1985). Parámetros como supervivencia, esperanza de vida, fecundidad, tasa reproductiva y tiempo generacional, revelan información sobre las condiciones ambientales óptimas para estos organismos (Stearns, 1976).

Existe una amplia variedad de organismos de que son usados en estas pruebas incluyendo las bacterias, algas, invertebrados y peces, sin embargo, los cladóceros tienden a ser más sensibles a los metales pesados que otros organismos (Zou y Bu, 1994, Ferrando *et al.*, 1996), además que por su pequeño tamaño son fáciles de cultivar en el laboratorio (Wong, 1992), aunado a que por su corto tiempo generacional, reproducción partenogenética y alta tasa de fecundidad responden rápidamente a los cambios ambientales (Gulati y Demott, 1997; Nandini y Sarma, 2002 a). Por estas características los cladóceros son excelentes organismos para pruebas de toxicidad.

Los cladóceros son pequeños crustáceos que están comprimidos lateralmente y encerrados en un caparazón bivalvo, quedando su cabeza de fuera. Son parte del zooplancton dulceacuícola (Margalef, 1983), siendo con frecuencia el grupo dominante en términos de biomasa (Mangas-Ramírez, 2002), además tienen una distribución amplia (Ruppert y Barnes, 1996). Ellos son parte importante de la

cadena trófica (Zou, 1997), ya que los filtradores herbívoros (Ruppert y Barnes, 1996) son el enlace entre fitoplancton y peces.

El cladócero *Ceriodaphnia dubia*, ha tenido un incremento en su uso para estudios de toxicidad principalmente en Norte América. *C. dubia* (Munger *et al.*, 1999) es más pequeña que *Daphnia* y no forma elementos dorsales extensos cuando esta expuesta a presión por depredación. Tiene un tiempo generacional más corto y es fácil de cultivar en el laboratorio (Nandini, 2000). *C. dubia* es filtradora polífaga alimentándose de algas, detritus y bacterias (Dodson y Frey, 1991). Su reproducción es partenogénica en casi todo el año y su fecundidad es alta cuando se encuentra a temperaturas de 18° a 25 °C. Por debajo de esta temperatura puede producir machos para la reproducción sexual y formación de efipios, los cuales contienen embriones que pueden sobrevivir a condiciones extremas y pueden eclosionar cuando las condiciones son óptimas (Negrea *et al.*, 1999). Las hembras tienen su primera puesta al día 10-14, aunque en condiciones óptimas en laboratorio generalmente la primera puesta es producida después de 3-5 días. Un puesta en el laboratorio generalmente produce de 4 a 10 neonatos (Hauri, 2001).

El género *Moina* se distribuye en casi todo el mundo, localizando la mayoría de las especies en climas tropicales a zonas templadas (Goulden, 1968). En México, este género se encuentra ampliamente distribuido con las especies *M. affinis*, *M. macrocopa americana*, *M. micrura*, *M. reticulata*, *M. wierzejskii*, *M. hutchinsoni*, *M. minuta* y *Moinodaphnia macleayi*, las cuales constituyen el 42% de las especies registradas a nivel mundial (Elías-Gutiérrez *et al.*, 1999). Este género se encuentra en cuerpos de agua temporales, lagos salinos u otros lagos con condiciones extremas (Margalef, 1983), en donde llegan a conformar hasta el 90% de la biomasa del zooplancton (Mangas-Ramírez *et al.*, 2002). La mayoría de tiempo las especies se reproducen por partenogénesis. Son de mediano tamaño, el cuerpo de las hembras partenogénicas adultas varían entre 0.5 y 1.8 mm dependiendo de la especie los machos siempre son de menor tamaño que la hembra. Tienen un tiempo generacional corto que va

de 2 a 5 días según la especie, rápido crecimiento poblacional y son uno de los cladóceros más fáciles de mantener en cultivo (Petrusek, 2002).

Más del 80% de los trabajos del efecto de tóxicos sobre cladóceros son realizados con géneros como *Daphnia*, *Ceriodaphnia* y *Moina*, siendo *Daphnia magna* el cladóceros más ampliamente usado en estas pruebas (APHA, *et al.*, 1998) y más específicamente para los países europeos. Los trabajos de Norteamérica consideran básicamente el uso de *Ceriodaphnia dubia*, mientras que el uso del género *Moina* es mucho más limitado, por lo que es necesario explorar la posibilidad de utilizar este género en pruebas toxicológicas en países subtropicales como México, ya que se distribuye de forma natural en el territorio y pueden aportar mejores datos sobre los sistemas acuáticos de nuestro país.

4. ANTECEDENTES

En los cuerpos de agua mexicanos, la contaminación por metales pesados ha sido atribuida a actividades industriales y domésticas registrando en varios de estos sistemas que el cobre es uno de los metales más abundantes. En Aguascalientes, se registró como uno de los principales contaminantes de los cuerpos de agua debido a la gran cantidad de industrias textiles de la zona (Rico-Martínez, 1998). En los sedimentos del río Coatzacoalcos también fue registrado como uno de los contaminantes más abundantes (Rosales-Hoz y Carranza-Edwards, 1998). En la columna de agua del lago de Chapala fueron registrados hasta 33.27 mg/L de este metal, de los cuales un 49.47% se encontraron biodisponibles (Rosales-Hoz, *et al.*, 2000).

La sensibilidad del zooplancton a concentraciones elevadas de cobre varía según la especie y las condiciones ambientales en las que se realizan las pruebas para la evaluación de la CL₅₀. El rotífero *Brachionus calyciflorus* con una alimentación de 1x10⁶ cels/ml del alga *Chlorella vulgaris* y a 23°C presentó una CL₅₀ a 24 h de 0.2 mg/L de CuSO₄ bajo las mismas condiciones, el rotífero *Brachionus patulus* registró una CL₅₀ a 24h de 0.1- 0.17 mg/L de CuSO₄. El cladóceros *Moina macrocopa* es una especie resistente al cobre, ya que con una alimentación de 1x10⁶ cels/ml del alga *Chlorella vulgaris* y a una temperatura de 22°C registró una CL₅₀ a 24h de 0.72 mg/L de CuSO₄. (Picazo-Paez, 2003).

En el caso de ensayos de toxicidad crónica, se registró para *M. macrocopa* que el cobre (CuSO₄) afecta las poblaciones de este cladóceros, ya que la exposición a 0.15mg/L reduce su promedio de vida un 50% menos que el control, a 0.02mg/L reduce su reproducción a 6 neonatos por hembra 50% menos que el control y a 0.08 disminuye la tasa intrínseca de crecimiento a -0.05 ind/ind/día. Cabe destacar que para este cladóceros el cobre es más tóxico que el cromo, níquel y zinc (Wong 1993).

Algunos tóxicos al encontrarse disponibles en bajas concentraciones pueden ejercer un efecto de hormesis, el cual es entendido como estímulo positivo de algún tóxico sobre los organismos, los cuales, ante un bajo nivel de estrés pueden reparar y sobrecompensar el daño producido a su

homeostasis, por lo que esta repuesta les confiere beneficios en su crecimiento y/o reproducción (Chapman, 2002). En el caso de la lombriz *Lumbricus rubellus*, expuesta a sedimentos con bajas concentraciones de cobre y cadmio, registra un efecto de hormesis, ya que incrementaron su supervivencia un 30% más que el control, por el contrario en concentraciones mayores de ambos metales su supervivencia y crecimiento disminuyó hasta un 50% respecto al control (Spurgeon *et al.*, 2004).

Daphnia carinata expuesta al insecticida Chlorpirifos (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate)(CPF), se registró el efecto de hormesis a través de generaciones sucesivas expuestas a este tóxico, a pesar de que la primera generación disminuyó su supervivencia y fecundidad, en la segunda generación se incrementó significativamente el número de descendientes por hembra de 62 en el control a 79 en el tratamiento con 0.00005 mg/L de insecticida. Sin embargo, en la tercera generación *Daphnia* declinó su CL₅₀ de 0.50 a 0.000.05 mg/L del tóxico (Zaluzniak y Nugogoda, 2006)

La mayoría de las investigaciones sobre toxicidad crónica centran su interés en la respuesta de una sola generación de organismos, siendo que estudios generacionales aportan datos más realistas sobre el efecto de los tóxicos. En el caso del díptero *Chironomus riparius* expuesto a cadmio (0.00017, 0.054, 0.159 mg/L Cd.) durante nueve generaciones consecutivas, disminuyó su reproducción durante las primeras cinco generaciones, pero a partir de la sexta y hasta la novena generación se presentó un incremento en esta, aunque simultáneamente disminuyó su supervivencia (Postma y Davids, 1995). El estudio de sustancias tóxicas a través de generaciones sucesivas de cladóceros, proporciona información más amplia sobre el efecto a largo plazo.

Bossuyt y colaboradores (2005), aclimataron a *Daphnia magna* a diferentes concentraciones de cobre durante cinco generaciones consecutivas, no encontrando cambios en la fase de exposición crónica durante las generaciones evaluadas. Sin embargo, después de la aclimatación a 0.001 y 0.100

mg/L de cobre durante cinco generaciones se presentó un incremento en la tolerancia a este metal, registrando una Concentración Efectiva Media (EC₅₀) a 48h de 0.193 y 0.296 mg/L respectivamente, a lo cual indicaron que el proceso de aclimatación depende más a la concentración de cobre disuelto (Cu⁺²).

El efecto adverso de los tóxico también ha sido reportado sobre *Daphnia magna* expuesta durante dos generaciones consecutivas a los pesticidas tetradifon (0.10 a 0.44 mg/L) y diazinon (0.05 a 1 mg/L) registrando una reducción en la reproducción existiendo un mayor impacto en la segunda generación, en donde el número de neonatos por hembra disminuyó hasta un 40% respecto al control en el primer caso y hasta un 93% en el segundo, también existió una disminución del tamaño de la puesta respecto al control, disminuyendo hasta un 31% y un 86% respectivamente, cabe destacar que no existieron modificaciones a la supervivencia (Villaroel *et al.*, 2000 y Sánchez *et al.*, 2000).

Por el contrario cuando *D. magna* es expuesta durante dos generaciones al herbicida molinate (3.77 a 18.85 mg/L) muestra que a mayor tiempo de exposición se reduce su supervivencia y reproducción, siendo este efecto más drástico en la primera generación (cladóceros no pre-expuestos al tóxico), en donde el número de neonatos por hembra se redujo hasta un 57% menos que el control y el tamaño de la puesta se redujo hasta un 31% menos que el control, (Sánchez *et la.*, 2004).

Se ha demostrado la acumulación de metales esenciales en organismo acuáticos como diferentes tipos de crustáceos, mostrando que la estrategia de acumulación varía entre los taxos y entre los metales ya que mientras el crustáceo *Palaemon elegans* expuesto al cobre (0.031.62 a 3.162 mg /L) pudo regular la concentración del metal presente en su cuerpo, el anfípodo *Echinogammarus pirloti* a y el baláno *Elminius. modestus*, acumularon el cobre disuelto en el medio sin presentar evidencia de regulación (Rainbow y White, 1989).

5. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el cobre es un micronutriente para los organismos vivos, en altas concentraciones es tóxico, siendo además un contaminante frecuente de los cuerpos de agua, en los cuales los organismos zooplanctónicos como los cladóceros pueden estar expuestos a este metal durante varias generaciones consecutivas, modificando su historia de vida, por lo que surge la necesidad de evaluar el impacto del cobre a través de generaciones sucesivas de cladóceros. Los cuales tienen importancia ecológica y económica, además, sus poblaciones son excelentes candidatas para realizar pruebas de toxicidad aguda (pruebas de CL₅₀) y crónica (experimentos de tabla de vida); ya que son de fácil manejo y cultivo en laboratorio, debido a su pequeño tamaño, corto ciclo de vida, alta tasa de fecundidad; además son sensibles a tóxicos como el cobre. Cabe mencionar, que la información de este grupo está casi exclusivamente confinada al género *Daphnia*, la cual no se encuentra de forma natural en México, surgiendo la necesidad de estudiar especies como *Moina micrura* y *Ceriodaphnia dubia*, las cuales presentan una amplia distribución en México y por ende, pueden aportar datos más precisos y adecuados para la zona.

6. OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de la toxicidad crónica del cobre sobre los parámetros demográficos de los cladóceros *Moina micrura* y *Ceriodaphnia dubia*, a través de generaciones sucesivas y en condiciones de laboratorio.

Particulares

- Determinar la concentración letal media (CL₅₀) de cobre a 24h. sobre los cladóceros *M. micrura* y *Ceriodaphnia dubia*.
- Evaluar la tabla de vida de los cladóceros *M. micrura* y *C. dubia*, durante generaciones sucesivas expuestas al 10% y al 30% de la CL₅₀ a 24h determinada para cada especie.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cultivo de cladóceros

Este trabajo se realizó con las especies de cladóceros, *Moina micrura* (980+15 μ m) y *Ceriodaphnia dubia* (759+7 μ m), procedentes del lago "Espejo de los Lirios" ubicado en Cuautitlan Izcalli Edo. Méx., ambas especies fueron identificadas y cultivados desde hace 2 años, en el Laboratorio de Zoología Acuática de la FES-Iztacala, UNAM.

Los cultivos de estas especies se mantuvieron en condiciones de laboratorio, a temperatura ambiente (23+1 °C), con un ciclo de luz:oscuridad 12:12h, utilizando como medio de cultivo agua reconstituida EPA (Nandini y Sarma 2000), la cual consistió en 96mg NaHCO₃, 60 mg CaSO₄, 60 mg MgSO₄ y 4 mg KCl por cada litro de agua (Anónimo, 1985). El medio de cultivo presentó un pH de 7.2 a 7.5. Este se cambio dos veces por semana, filtrando los cladóceros con una malla de 100 μ m de abertura. La alimentación de estos organismos fue a base de la microalga *Scenedesmus acutus* (18.2+0.4 μ m) (Nandini y Sarma, 2000).

7.2. Cultivo de microalgas

Las microalgas *Scenedesmus acutus* se cultivaron en medio Bold (Borowitzka y Borowitzka, 1988). Este se preparó con agua destilada, se colocó en botellas de plástico transparente de 2 L, con aireación e iluminación fluorescente constante (Mangas-Ramírez, *et al.*, 2001), a una temperatura de 18° C; cada tercer día se agregó bicarbonato de sodio, como fuente de carbón (Sarma, 1996). Una vez alcanzada su fase exponencial, se cosecharon y colocaron a 4°C, para la sedimentación de las células. Posteriormente se desecho el agua de las botellas, concentrando los sedimentos y a partir de ahí realizar el conteo en una cámara de Neubauer (Sarma *et al.*, 2001) y así conocer la concentración de microalgas que se tenía y calcular la concentración con la que se trabajó.

7.3. Preparación y análisis del tóxico

Se preparó una solución stock diluyendo 1g de CuSO_4 en 1 litro de agua destilada (1g CuSO_4/L) a partir de esta solución stock se realizaron diluciones en medio EPA para tener las concentraciones de tóxico necesarias que se emplearon en las fase de toxicidad aguda y crónica. Se realizaron mediciones de la solución stock mediante la técnica de espectroscopia por emisión de plasma (APHA, *et al.*, 1998), para determinar la concentración real de cobre que se tenía, registrando una variación del 6%, respecto a los cálculos teóricos del peso atómico de la molécula de CuSO_4 (ver anexo 1).

Cabe destacar que para minimizar la contaminación por metales pesados que pudieran interferir con esta investigación, todos los materiales en contacto con los cultivos y experimentos de toxicidad aguda y crónica fueron sumergidos por 24hrs en HNO_3 al 5% y posteriormente fueron enjuagados con agua destilada.

7.4. Ensayos de toxicidad aguda

a) Biobusqueda

Las pruebas de toxicidad aguda se basan en la resistencia de los individuos neonatos, que son los más sensibles proporcionando datos más exactos sobre la población (Mangas-Ramírez, 2002); así, por especie, se colocaron 20 individuos neonatos (<24hrs de edad) en frascos de vidrio, con concentraciones geométricas de cobre, en un intervalo de 0.05 a 1 mg/L, en un volumen total de 50 ml de medio de cultivo EPA, con 0.5×10^6 cels/ml de *S. acutus* como alimento y a 23 ± 1 °C (2 especies x 5 concentraciones x 4 repeticiones), más un grupo control sin adición del tóxico.

Con la finalidad de observar que intervalo de concentraciones de tóxico resulta letal para cada especie, se estimó la supervivencia después de 24h. de exposición al tóxico, para lo cual se realizó el conteo de los organismos en un microscopio estereoscópico, una caja de acrílico (5x5cm y una profundidad aproximada de 1.5 cm) y una pipeta Pasteur (Mangas-Ramírez, 2002). Posteriormente se

analizaron los datos obtenidos mediante el método PROBIT (Finney, 1971), para así estimar la Concentración Letal Media (CL₅₀) para cada especie.

7.5. Ensayos de toxicidad crónica

Para los estudios de toxicidad crónica, se requiere que el efecto del tóxico sea subletal en periodos prolongados, por lo que se calculó el 10% y el 30% de la CL₅₀, los cuales corresponden a 0.035 y 0.105 mg/L de CuSO₄ para *M. micrura* y 0.066 y 0.198 mg/L de CuSO₄ para *C. dubia*, cabe mencionar que en lo sucesivo estas concentraciones solo se mencionaran como 10%CL₅₀ y 30%CL₅₀.

Cada tabla de vida se inició con una cohorte de 20 individuos neonatos (<24hrs de edad), los cuales se colocaron en frascos de vidrio, con el 10%CL₅₀ o el 30%CL₅₀ según el caso y con 0.5x10⁶ cels/ml de la microalga *S. acutus* como alimento, todo esto en medio EPA en un volumen total de 50 ml y a 23± 1°C, (2 especies x 2 concentraciones de tóxico x 5 replicas x 4 generaciones) y se tuvo un grupo control para cada especie. hasta que murió el último individuo de la cohorte inicial de cada generación

Diariamente se renovó el medio con la concentración de tóxico y nivel de alimentación correspondiente. Simultáneamente se contó la cohorte inicial y su descendencia, separando inmediatamente la descendencia para posteriormente iniciar los ensayos de la generación siguiente. Los conteos se realizaron en un microscopio estereoscópico, una caja de acrílico para zooplancton (5x5cm y una profundidad aproximada de 1.5 cm) y una pipeta Pasteur. Cada tabla de vida se finalizó hasta que murió el último individuo de la cohorte inicial, siendo de 17 a 24 días para *M. micrura* y de 27 a 53 días para *C. dubia*.

Cabe resaltar, que estas tablas de vida se realizaron seriadas. De un cultivo masivo libre de tóxico se tomó una cohorte de 20 individuos neonatos (<24hrs de edad) con los cuales se inició la tabla de vida de la generación (F0), la descendencia producida en la primer etapa de reproducción de esta

cohorte se utilizó para iniciar la tabla de vida de la primera generación que nace en presencia de cobre (F1), los primeros descendientes de ésta fueron utilizados para iniciar la siguiente generación (F2) y así sucesivamente (Fig. 1).

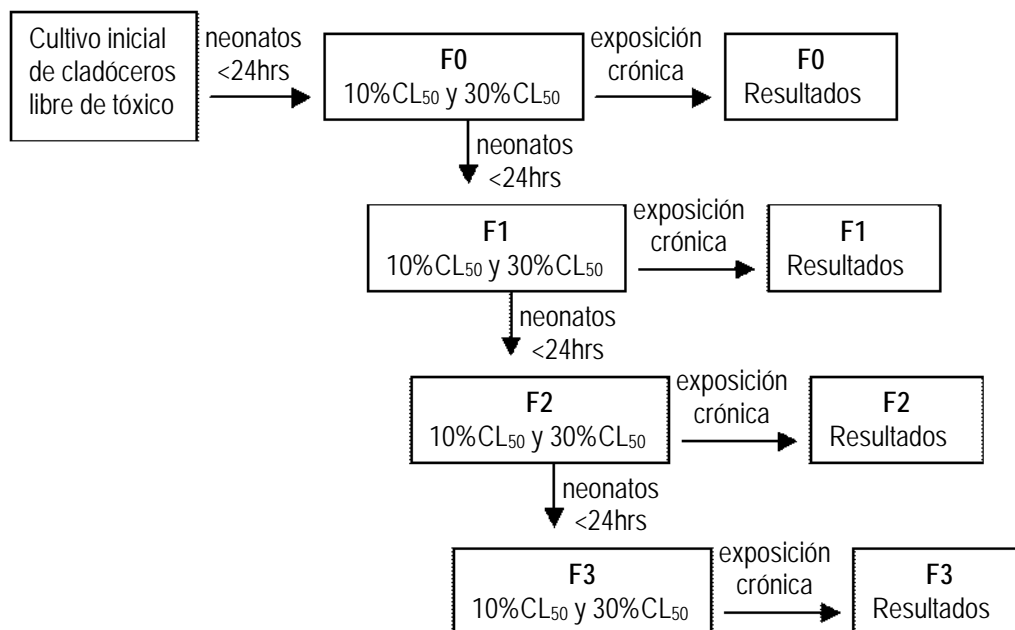


Fig. 1 Diseño experimental de la toxicidad crónica generacional para *Moina micrura* y *Ceriodaphnia dubia*

Las variables demográficas que fueron evaluadas según Krebs (1985), Pianka (1988) y Gotelli (1995) fueron las siguientes:

Parámetro	Notación	Fórmula	Unidades	Significado
Supervivencia	$n_{(0)}$ = individuos iniciales $n_{(x)}$ = supervivientes al tiempo x	$lx = n_{(x)} / n_{(0)}$	hembras / día	proporción de la cohorte inicial que sobrevive al tiempo x
Fecundidad	$l_{(x)}$ = supervivencia al tiempo x $m_{(x)}$ = neonatos al tiempo x	$m_x = \sum l_{(x)} \cdot m_{(x)}$	neonatos / hembra / día	neonatos por hembra al tiempo x
Promedio de vida	$nx1$ = supervivientes al día x $nx2$ = supervivientes al día siguiente	$Lx = nx1 + nx2 / 2$	días	tiempo promedio que vivieron los organismos
Tiempo generacional	lx = supervivencia m_x = fecundidad x = edad	$T = \frac{\sum l_{(x)} \cdot m_{(x)} \cdot x}{R_0}$	días	edad promedio de las hebras a la primera reproducción
Tasa bruta de reproducción	m_x = fecundidad	$R = \sum_0^{\alpha} m_x$	neonatos	neonatos totales producidos en todo el ciclo de vida
Tasa neta de reproducción	lx = supervivencia m_x = fecundidad	$R_0 = \sum_0^{\alpha} lx \cdot mx$	neonatos / hembra	neonatos por hembra producidos en el ciclo de vida
Tasa de crecimiento poblacional	e = 2.718 x = edad $lxmx = R_0$	$r = \sum_{x=0}^n e^{-rx} lxmx = 1$	individuos / individuos / día	cambio en el tamaño de la población por unidad de tiempo

7.6. Análisis estadístico

Para definir las diferencias significativas del efecto de las dos concentraciones de cobre respecto al control de cada generación y entre generaciones se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía y ANOVA de dos vías (software STATISTICA 5). Una vez establecidas las diferencias significativas, se aplicó un análisis *pos hoc* de comparación múltiple Tukey (software STATISTICA 5) para determinar la diferencia entre tratamientos específicos.

8. RESULTADOS

8.1. Toxicidad aguda

En este estudio se registró una Concentración Letal Media (CL₅₀) 24h para *M. micrura* de 0.35mg/L CuSO₄ ± ES 0.026 mientras que para *C. dubia* fue de 0.66 mg/L CuSO₄ ± ES 0.041. A partir de estos resultados se obtuvieron las concentraciones de cobre para la fase de toxicidad crónica, calculando el 10% y el 30% de la CL₅₀ a 24h de cada especie, correspondiendo a *M. micrura* 0.035 y 0.105 mg/L de CuSO₄ y para *C. dubia* 0.066 y 0.198 mg/L de CuSO₄. Cabe mencionar que en lo sucesivo solo se mencionaran como 10%CL₅₀ y 30%CL₅₀

8.2. Toxicidad crónica.

a. *Moina micrura*

Supervivencia

La supervivencia de *Moina micrura* se vio modificada por la exposición generacional al cobre. En las generaciones F0 y F1 la supervivencia de los grupos control, 10%CL₅₀ y 30%CL₅₀ se registraron dentro de un intervalo de 18 a 20 días, mientras que en la F2 existió un incremento en los grupos cobre 10% y 30%CL₅₀ alcanzando hasta 24 días y en la F3 se vuelve a registrar un intervalo de 18 a 20 días (Fig. 2). El tiempo que cada grupo logro mantener la mitad de la población confirma la tendencia antes descrita, registrando en las generaciones F0, F1 y F3 un intervalo de 11-12 días y únicamente en la F2 se presenta un incremento en los grupos cobre registrando 10% y 30%CL₅₀ 16 días y 17 días (Fig. 2).

Fecundidad

La exposición al cobre no afecto la madurez sexual de *M. micrura* ya que la edad de la primera reproducción fue al tercer o cuarto día en todas las generaciones y en todos los grupos (Fig. 3). La reproducción se mantuvo a lo largo de la supervivencia, cabe resaltar que sólo en la F3 la exposición al nivel más alto de tóxico disminuyó la reproducción de *M. micrura*.

Moina micrura

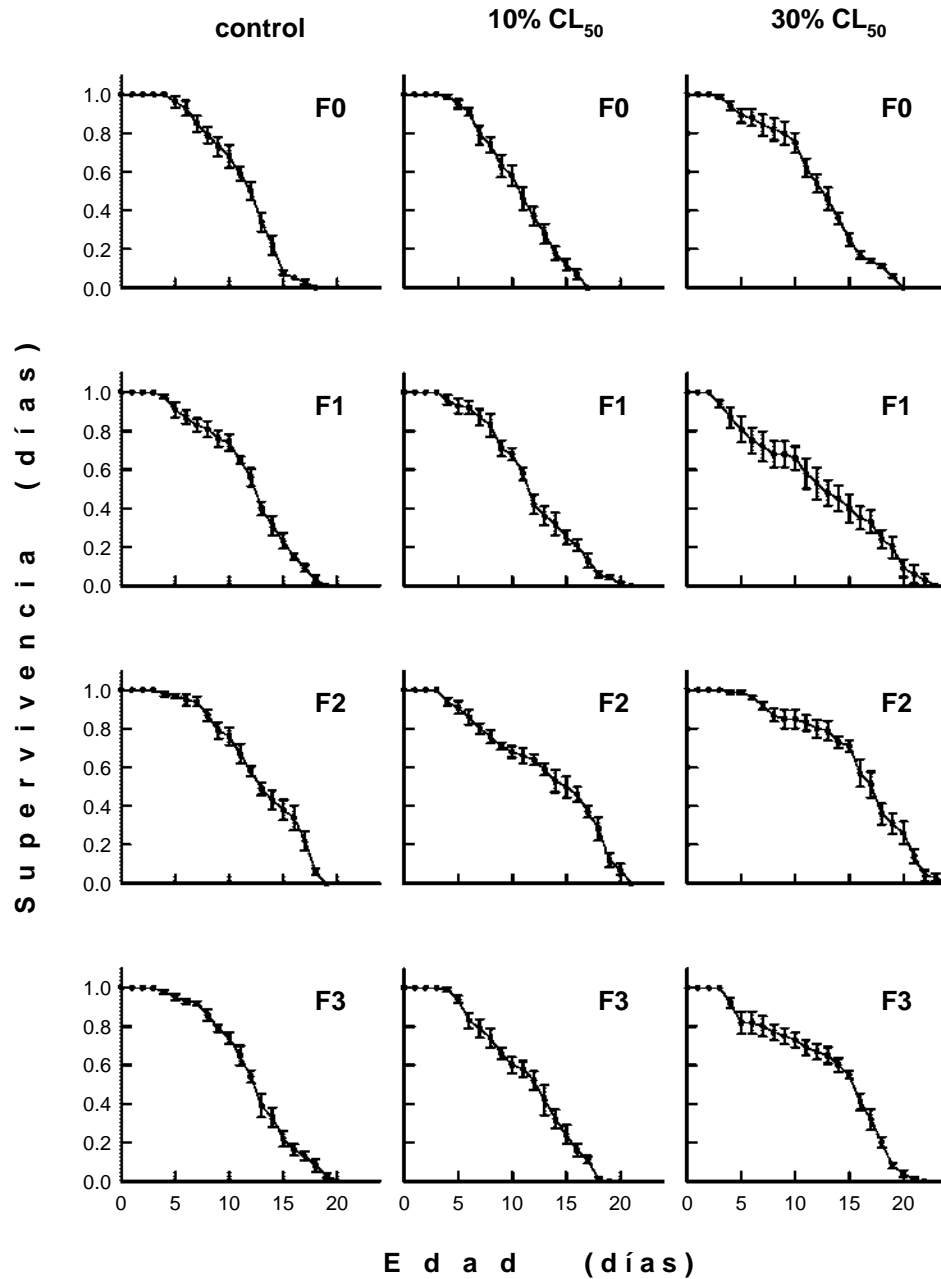


Fig. 2- Supervivencia de *Moina micrura*, alimentada con 0.5×10^6 cels /ml de *Scenedesmus acutus* durante la exposición crónica a dos concentraciones de cobre (CuSO_4). Los puntos corresponden al promedio y \pm error estándar de 5 replicas.

Moina micrura

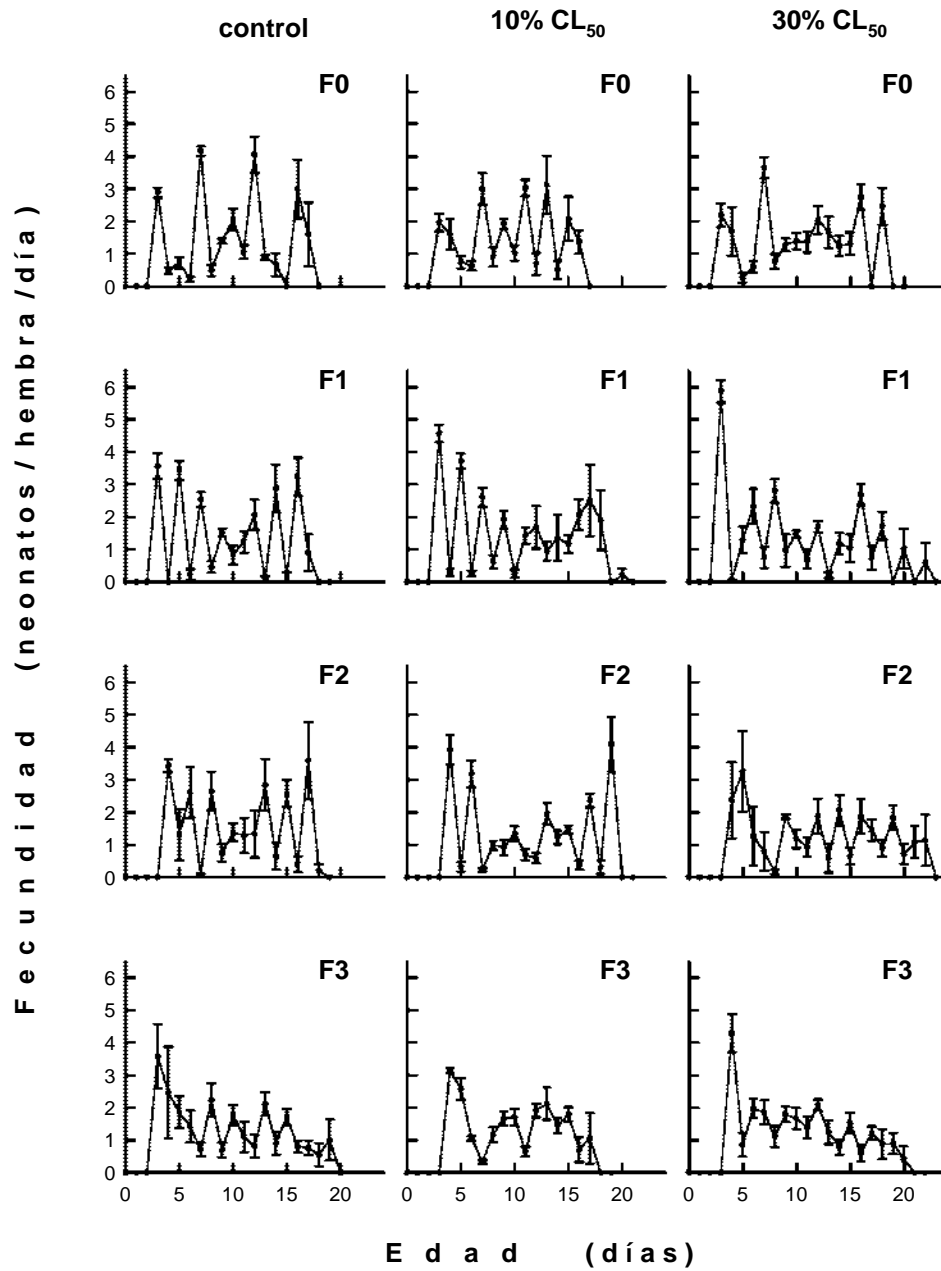


Fig. 3- Fecundidad de *Moina micrura*, alimentada con 0.5×10^6 cels /ml de *Scenedesmus acutus* durante la exposición crónica a dos concentraciones de cobre (CuSO_4). Los puntos corresponden al promedio y \pm error estándar de 5 replicas.

Promedio de vida

El promedio de vida para *M. micrura* fue alrededor de 12 días en todas las generaciones y en todos los grupos, excepto en la generación F2 donde se incrementó en el grupo 30%CL₅₀ registrando 17 días (Fig. 4), estadísticamente fue mayor que el grupo control respectivo (Prueba de Tukey) (Fig. 4).

Tiempo generacional

La exposición crónica al cobre incrementó el tiempo generacional de *M. micrura* en las últimas generaciones. En la F0 y F1 se registró un intervalo de 7 y 8 días tanto para los grupos control como para los dos niveles de cobre sin encontrar diferencias estadísticas (Prueba de Tukey) (Fig. 4), mientras en la F2 en el grupo 30%CL₅₀ y en la F3 en los dos niveles de cobre se registraron hasta dos días más que en el grupo control respectivo (Fig. 4) Cabe mencionar que se registraron diferencias significativas entre generaciones ($P < 0.001$) (Tabla 1) siendo ambos niveles de cobre en las F2 y F3 significativamente más altos que el control (Prueba de Tukey) (Fig. 4).

Tasa bruta de reproducción

En general, el cobre no alteró la tasa bruta de reproducción de *M. micrura* registrando en todas las generaciones evaluadas un intervalo de 23 a 25 neonatos tanto para los grupos control como para los grupos cobre 10%CL₅₀ y 30%CL₅₀ (Fig. 4). Cabe resaltar, que se presentó un incremento en la F1, en los grupos 10%CL₅₀ y 30%CL₅₀ registrando 27 neonatos en ambos grupos, sin embargo, no existieron diferencias significativas entre generaciones ($P > 0.05$) (Tabla 1) ni entre los grupos control y cobre (Prueba de Tukey) (Fig.4).

Tasa neta de reproducción

La tasa neta de reproducción fue 33% menor que la tasa bruta. En todas las generaciones evaluadas se registró un intervalo de 14 a 18 neonatos/hembra tanto en los grupos control como en los dos niveles de cobre, excepto en la F3, en donde el grupo 10%CL₅₀ presentó una disminución,

registrando tan solo 12 neonatos/hembra, diferencia significativa respecto al control (Prueba de Tukey) (Fig 4).

Tasa de crecimiento poblacional

Al analizar la tasa de crecimiento poblacional de *M. micrura* es posible observar el efecto dual beneficio-adverso que la exposición crónica al cobre generó a través de las cuatro generaciones evaluadas. A pesar de que en la F0 se registraron valores similares para los grupos control, 10% y 30%CL₅₀, en la generación F1 existió un incremento en los grupos 10%CL₅₀ y 30%CL₅₀ registrando 0.6 individuos/individuos/día, lo cual representa un incremento del 17% respecto al control. Por el contrario en la generación F3 existe una disminución en los grupos 10%CL₅₀ y 30%CL₅₀ registrando un 26% menos que el control (Fig. 4). Estas diferencias entre generaciones fueron altamente significativas ($P < 0.001$) (Tabla 1) y tanto en la generación F1 como en la F3 los dos niveles de cobre fueron estadísticamente diferentes al control (Prueba de Tukey) (Fig. 4).

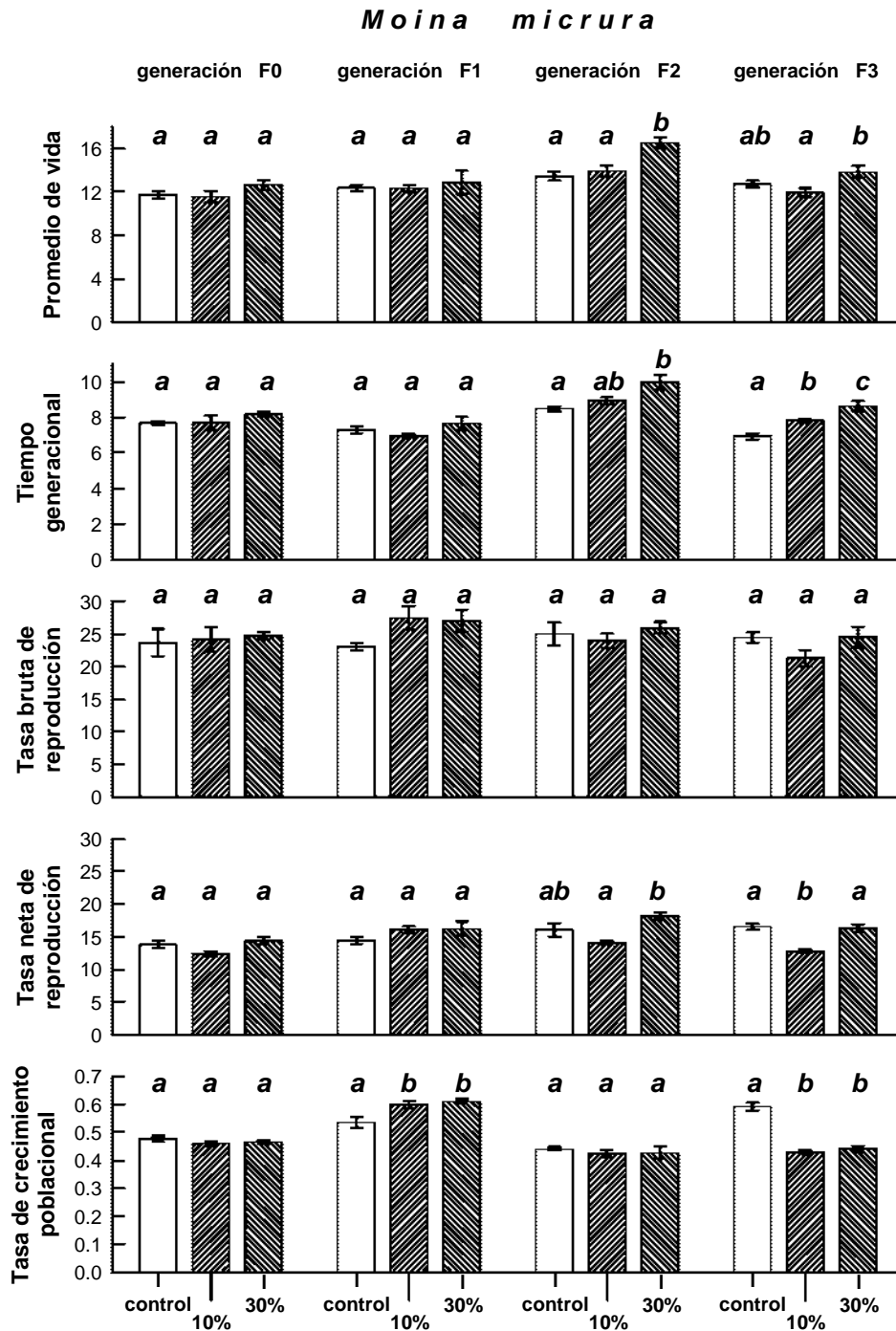


Fig. 4- Parámetros demográficos de *Moina micrura*, alimentados con 0.5×10^6 cels /ml de *Scenedesmus acutus* durante la exposición crónica a dos concentraciones de cobre (CuSO_4). Se señalan valores promedio y \pm error estándar de 5 replicas. Para cada generación las barras con letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey.

Tab. 2- Resumen del ANOVA de 2 vías del efecto de la exposición crónica al cobre sobre los parámetros demográficos de *Moina micrura*.

***=P<0.001, **=P<0.01, *=P<0.05, ns=P>0.05

Fuente de variación	GL	SC	CM	F	P
Promedio de vida					
Factor A (generaciones)	3	59.3010	19.7670	14.9655	***
Factor B (tratamientos)	2	29.3886	14.6943	11.1250	***
Interacción A x B	6	11.9788	1.9965	1.5115	ns
Error	48	63.4000	1.3208		
Totales	59	164.0683			
Tiempo generacional					
Factor A (generaciones)	3	27.0991	9.0330	29.0386	***
Factor B (tratamientos)	2	11.1239	5.5619	17.8800	***
Interacción A x B	6	3.9639	0.6607	2.1238	ns
Error	48	14.9314	0.3111		
Totales	59	57.1183			
Tasa bruta de reproducción					
Factor A (generaciones)	3	48.8346	16.2782	1.5923	ns
Factor B (tratamientos)	2	26.8515	13.4258	1.3133	ns
Interacción A x B	6	78.6191	13.1032	1.2817	ns
Error	48	490.7160	10.2233		
Totales	59	645.0212			
Tasa neta de reproducción					
Factor A (control)	3	57.2608	19.0869	9.9047	***
Factor B (Cu)	2	58.8741	29.4370	15.2756	***
Interacción A x B	6	45.9736	7.6623	3.9761	**
Error	48	92.4990	1.9271		
Totales	59	254.6075			
Tasa de crecimiento poblacional					
Factor A (control)	3	0.1868	0.0623	80.0175	***
Factor B (Cu)	2	0.0120	0.0060	7.7365	**
Interacción A x B	6	0.0878	0.0146	18.8061	***
Error	48	0.0373	0.0008		
Totales	59	0.3240			

b. *Ceriodaphnia dubia*
Supervivencia

Existió un impacto negativo del cobre sobre la supervivencia de *Ceriodaphnia dubia*, ya que mientras se registró un intervalo de 42 a 53 días para los grupos control y 10%CL₅₀ de las cuatro generaciones, en el nivel más alto de cobre 30%CL₅₀ disminuyó a un intervalo de 27 a 29 días a través de las generaciones (Fig. 5). Atendiendo al tiempo que logro mantenerse la mitad de la población, es evidente que el 30%CL₅₀ presentó una progresiva disminución de la supervivencia de *C. dubia* a través de las generaciones evaluadas, alcanzando en la ultima generación tan solo 9 días, siendo 11 días menos que en el grupo control (Fig.5).

Fecundidad

La madurez sexual de los individuos de *C. dubia* se presentó al día 5 y la reproducción se mantuvo a largo de todo el experimento, sin embargo, para el caso específico de la F3 en el grupo 30%CL₅₀ se retraso hasta el día 7 (Fig 6). El grupo 10%CL₅₀ de las cuatro generaciones evaluadas presentó una tendencia de reproducción similar al control registrando en la F0 hasta 3 individuos/hembra/día y hasta de 5 individuos/hembra/día para la F3, mientras que el nivel más alto de cobre disminuyo la fecundidad de *C. dubia* en todas las generaciones evaluadas llegando a registrar hasta menos de un individuos/hembra/día en las F0 y F3 (Fig. 6).

Promedio de vida

El promedio de vida se vio afectado a mayor concentración de cobre y a mayor tiempo de exposición al tóxico. En las generaciones evaluadas el grupo 10% se mantuvo muy similar al grupo control registrando en ambos un intervalo de 20 a 28 días, por el contrario el grupo 30%CL₅₀ registró un intervalo de 17 a 12 días disminuyendo progresivamente a partir de la F1 y llegando a registrar en la F3 hasta un 58% menos que en el grupo control (Fig. 7). Estas diferencias fueron significativas entre las

Ceriodaphnia dubia

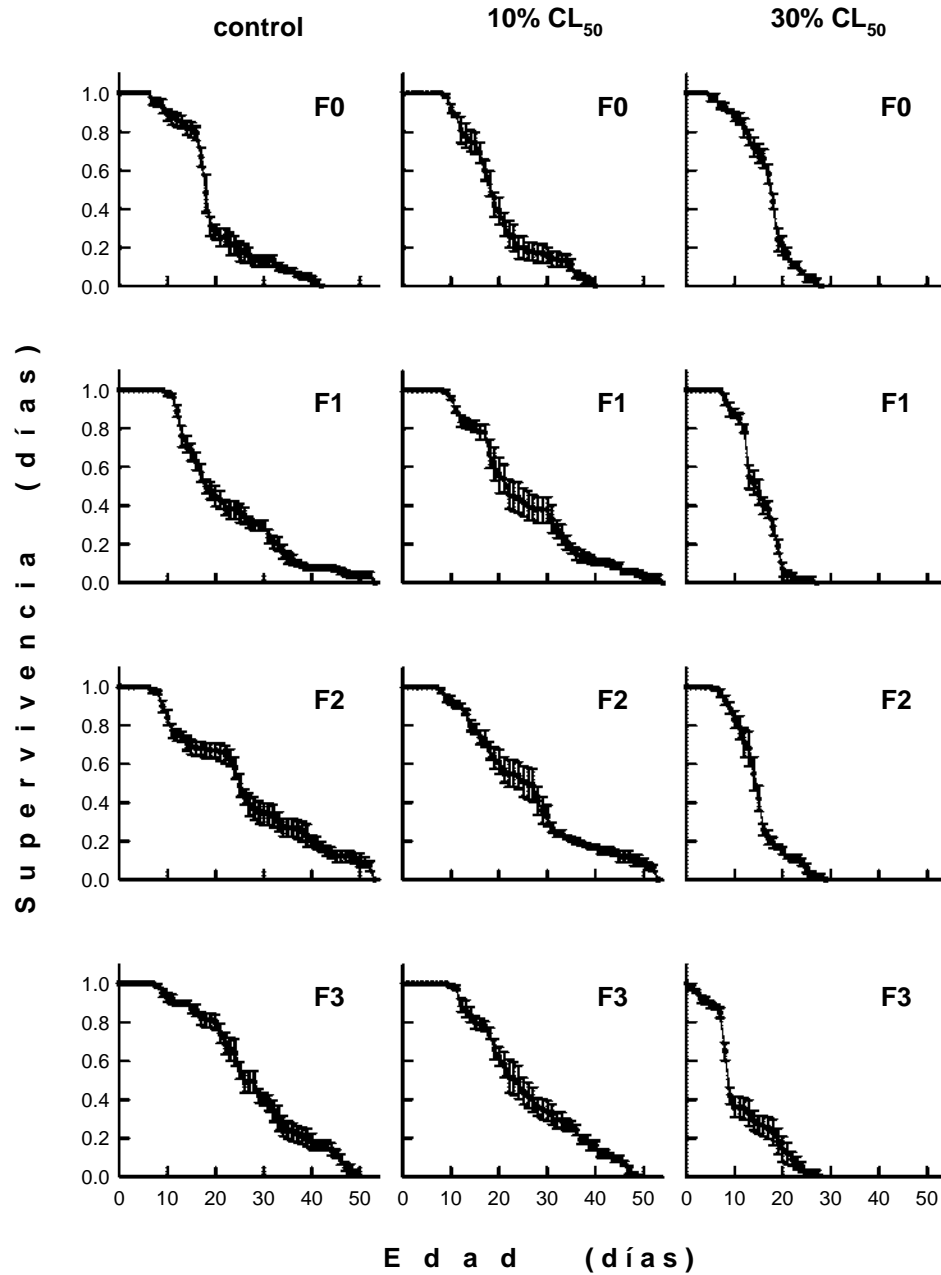


Fig. 5- Supervivencia de *Ceriodaphnia dubia*, alimentada con 0.5×10^6 cels /ml de *Scenedesmus acutus* durante la exposición crónica a dos concentraciones de cobre (CuSO_4). Los puntos corresponden al promedio y \pm error estándar de 5 replicas.

Ceriodaphnia dubia

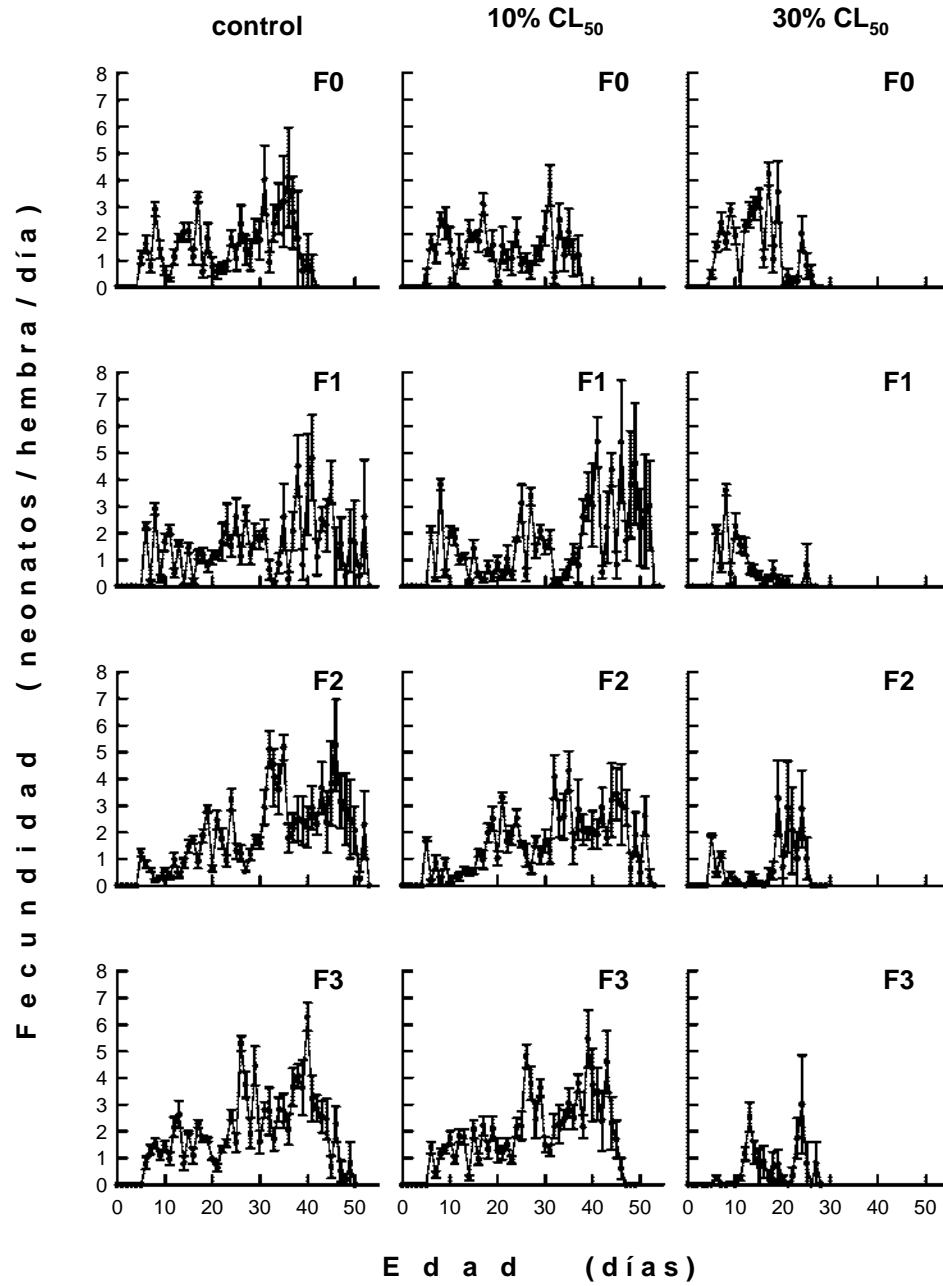


Fig. 6- Fecundidad de *Ceriodaphnia dubia*, alimentada con 0.5×10^6 cels /ml de *Scenedesmus acutus* durante la exposición crónica a dos concentraciones de cobre (CuSO_4). Los puntos corresponden al promedio y \pm error estándar de 5 replicas.

generaciones ($P < 0.001$) (Tabla 2), siendo el grupo 30%CL₅₀ significativamente menor al control en las generaciones F1, F2 y F3 (Prueba de Tukey) (Fig. 7)

Tiempo generacional

En todas las generaciones evaluadas los grupos 10%CL₅₀ fueron similares al grupo control registrando para ambos un intervalo de 14 a 25 días, mientras que el nivel alto de cobre disminuyó el tiempo generacional de *C. dubia* a partir de la F1 y hasta la F3, registrando un intervalo de 9 a 14 días, cabe mencionar que en la F2 el grupo 30%CL₅₀ fue 15 días menor que el control (Fig 7). La diferencia entre generaciones fue significativa ($P < 0.001$) (Tabla 2), siendo evidente que en las generaciones F1, F2 y F3 el grupo 30%CL₅₀ fue menor al grupo control (Prueba de Tukey) (Fig 7).

Tasa bruta de reproducción

Al igual que en los parámetros anteriores, en la tasa bruta de reproducción, el grupo 10%CL₅₀ presentó fluctuaciones, pero en todas las generaciones evaluadas siempre fue muy similar control registrando un intervalo de 49 a 97 neonatos. Por el contrario el grupo 30% disminuyó de 36 neonatos en la F0 a 16 neonatos en la F3, siendo en esta última generación hasta 73 neonatos menor que el control (Fig. 7). Estas diferencias entre generaciones son significativas ($P < 0.001$) (Tabla 2), siendo el grupo 30%CL₅₀ estadísticamente diferente al control en todas las generaciones (Prueba de Tukey) (Fig. 7). Cabe mencionar, que en la F1 el 10%CL₅₀ presentó una tendencia a sobrepasar la tasa del control, sin embargo esta diferencia no fue significativa (Tabla 2)(Fig 7)

Tasa neta de reproducción

El grupo 10%CL₅₀ en todo momento fue similar al grupo control registrando en la F0 23 neonatos/hembra para ambos grupos y para la F3 43 neonatos/hembra, por el contrario el grupo 30%CL₅₀ disminuido de 23 neonatos/hembra en la F0 a tan solo 3 neonatos/hembra en la F3, obviamente fue menor que el grupo control (Fig. 7). La diferencia entre generaciones fue significativa

($P < 0.001$) (Tabla 2) y el grupo 30% significativamente menor al control en todas las generaciones excepto en la F0 en donde fue similar al control (Prueba de Tukey) (Fig. 7).

Tasa de crecimiento poblacional

La tasa de crecimiento poblacional muestra gran similitud entre los grupos control y los dos niveles de cobre evaluados en las tres primeras generaciones, registrando en la F0 de 0.31 a 0.32 individuos/individuos/día, en la F1 0.29 individuos/individuos/día y para la F2 de 23 a 24 individuos/individuos/día (Fig. 7). En el caso de la F3 el control y el grupo 10%CL₅₀ fueron similares registrando 0.27 individuos/individuos/día, por el contrario el grupo el 30%CL₅₀ de esta generación tan sólo registro una tasa de 0.072 individuos/individuos/día. La diferencia fue significativa entre las generaciones ($P < 0.001$) (Tabla 2), sin embargo solo en la F3 el 30%CL₅₀ fue significativamente más bajo al control (Prueba de Tukey) (Fig. 7).

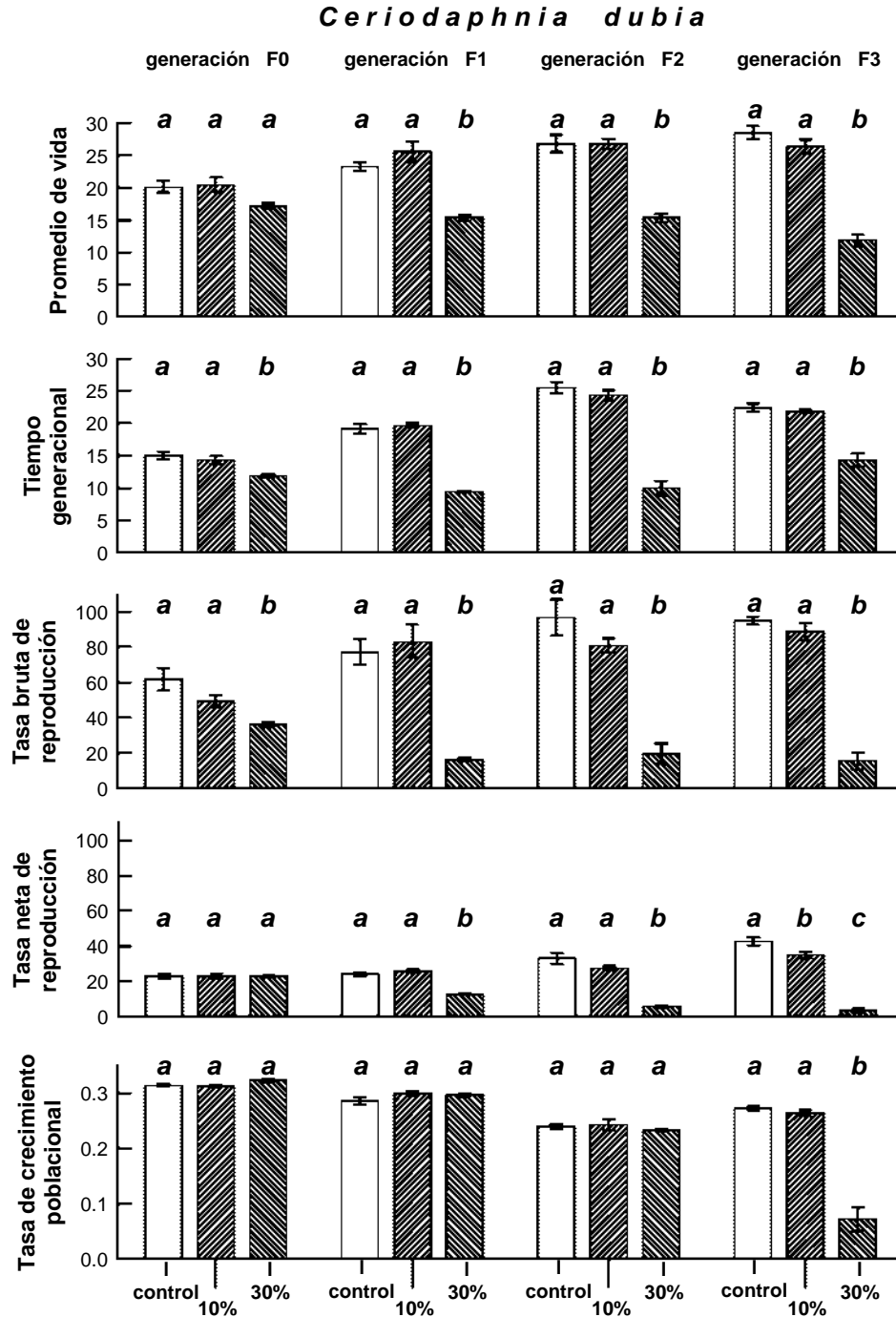


Fig. 7- Parámetros demográficos de *Ceriodaphnia dubia*, alimentados con 0.5×10^6 cels /ml de *Scenedesmus acutus* durante la exposición crónica a dos concentraciones de cobre (CuSO_4). Se señalan valores promedio y \pm error estándar de 5 replicas. Para cada generación las barras con letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey.

Tab. 2- Resumen del ANOVA de 2 vías del efecto de la exposición crónica al cobre sobre los parámetros demográficos de *Ceriodaphnia dubia*.

***=P<0.001, **=P<0.01, *=P<0.05, ns=P>0.05

Fuente de variación	GL	SC	CM	F	P
Promedio de vida					
Factor A (generacionaes)	3	117.4056	39.1352	8.6302	***
Factor B (tratamientos)	2	1278.3428	639.1714	140.9522	***
Interacción A x B	6	298.1472	49.6912	10.9581	***
Error	48	217.6640	4.5347		
Totales	59	1911.5596			
Tiempo generacional					
Factor A (generaciones)	3	388.8780	129.6260	54.6653	***
Factor B (tratamientos)	2	1051.4294	525.7147	221.7021	***
Interacción A x B	6	255.0240	42.5040	17.9246	***
Error	48	113.8208	2.3713		
Totales	59	1809.1522	700.2160		
Tasa bruta de reproducción					
Factor A (generaciones)	3	2953.2900	984.4300	5.7692	**
Factor B (tratamientos)	2	44147.2200	22073.6100	129.3619	***
Interacción A x B	6	7315.2000	1219.2000	7.1451	***
Error	48	8190.4608	170.6346		
Totales	59	62606.1708			
Tasa neta de reproducción					
Factor A (control)	3	324.3420	108.1140	9.1181	***
Factor B (Cu)	2	4396.9980	2198.4990	185.4168	***
Interacción A x B	6	2454.2820	409.0470	34.4982	***
Error	48	569.1389	11.8571		
Totales	59	7744.7609	2727.5171		
Tasa de crecimiento poblacional					
Factor A (control)	3	0.120243	0.040081	140.3783	***
Factor B (Cu)	2	0.0301	0.0150	52.7086	***
Interacción A x B	6	0.0989	0.0165	57.7212	***
Error	48	0.0137	0.0003		
Totales	59	0.2630			

9. DISCUSION

Ante la toxicidad aguda del cobre existen variaciones intraespecíficas entre el mismo grupo de organismos. En este estudio se registró que la Concentración Letal Media (CL₅₀) 24h para *M. micrura* fue de 0.35mg/L CuSO₄ ± ES 0.026 mientras que para *C. dubia* fue de 0.66 mg/L CuSO₄ ± ES 0.041, observando una diferencia aproximadamente del doble. Bossuyt y Janssen (2005) explican que la sensibilidad a concentraciones agudas de cobre varía entre especies de cladóceros, debido a la capacidad de regulación homeostática del cobre de cada especie, a la permeabilidad de las membranas o al tamaño de los organismos. En vista de esta variación entre especies, es necesario tener un panorama más amplio y estudiar la sensibilidad de diferentes especies de cladóceros que aporten datos más precisos del efecto del cobre en los cuerpos de agua y no solo contar con información para *Daphnia magna*, la cual no se encuentra distribuida de forma natural en México y no es representativa de los cuerpos de agua mexicanos dado que presenta una sensibilidad diferente a las especies nativas.

La sensibilidad de los organismos a la toxicidad aguda del cobre, también puede variar debido a factores como el nivel de alimento. En la presente investigación la evaluación de la CL₅₀ para ambas especies de cladóceros se realizó incluyendo como alimento 0.5 x10⁶ cels/ml del alga *Scenedesmus acutus*, lo cual pudo modificar los valores de la CL₅₀ 24h registrada para ambas especies, situándolas por encima de los valores publicados para pruebas similares pero sin alimento. Harmon y colaboradores (2003) estimaron una Concentración Efectiva Media (CE₅₀) de 0.036 mg/L de Cu para *C. dubia*, cabe destacar que la CE₅₀ es un parámetro equiparable con la CL₅₀, dado que frecuentemente expresa la concentración a la cual la mitad de los organismos probados presentan inmovilidad total. Por su parte Belanger y colaboradores (1989), obtuvieron una CL₅₀ 48h de 0.027 mg/L Cu, Kim y colaboradores (2001) registraron una CL₅₀ de 0.020 mg/L Cu, USEPA (1985) registró una CL₅₀ 48hrs de 0.017 mg/L Cu.

A pesar de la diferencia producida por el nivel del alimento, la sensibilidad de *M. micrura* y *C. dubia* registrada en este estudio se encuentra dentro del intervalo de cobre publicado para otras especies de zooplancton evaluadas en condiciones similares a las de este trabajo. Sarma y colaboradores (2000) reportaron para el rotífero *Brachionus calyciflorus* una CL_{50} 24 h de 0.2 mg/L de $CuSO_4$, mientras que para el rotífero *Brachionus patulus* tan solo registraron 0.01 mg/L $CuSO_4$, por su parte Picazo-Paez (2003) registró para el cladóceros *M. macrocopa* una CL_{50} a 24 h de 0.72 mg/L de $CuSO_4$.

En el presente estudio, la concentración real de cobre calculada a partir de la concentración nominal correspondiente a la CL_{50} 24h registrada para *M. micrura* y *C. dubia* fue de 0.264 y 0.140 mg/L Cu respectivamente, siendo ambas especies más sensibles a este metal que los datos publicados para *Daphnia magna* por Bossuyt y Janssen (2004), quienes registraron una CE_{50} a 48h de 0.245 +11 mg/L Cu, siendo más resistente, dado que el tiempo de exposición al tóxico fue el doble que en la presente investigación. *D. magna* fue considerada para establecer la NOM-001-ECOL-1996 la cual menciona que el límite permisible de este metal para el agua potable de México son 2 mg/L de cobre total. Estos valores están por encima de las concentraciones agudas y crónicas en que los cladóceros *M. micrura* y *C. dubia* pueden sobrevivir bajo las condiciones evaluadas en la presente investigación. Se requiere estudiar con más detenimiento el efecto del cobre en los ecosistemas acuáticos ya que probablemente afecte negativamente las poblaciones de organismos y esto lleva a desestabilizar las redes tróficas. Investigaciones como la presente son necesarias para conocer la sensibilidad de especies mexicanas y estudiar la posibilidad de utilizar especies nativas que aporten datos más precisos para México.

Las especies *M. micrura* y *C. dubia* han sido utilizadas como organismos de estudio en pruebas del nivel óptimo de alimento, así como el consumo de cianobacterias y la sensibilidad a tóxicos. Las características demográficas de *M. micrura* y *C. dubia* al encontrarse libres de tóxicos fueron muy similares a los datos publicados por otros autores para estos géneros. En la presente investigación el

promedio de vida de *M. micrura* fue de 11 a 13 días, mientras que para *C. dubia* fue de 19 a 29 días. Datos similares fueron publicados por Benider (2002) y Nandini y Sarma (2000) para el género *Moina*, registrando un promedio de vida de 5 a 13 días. Por su parte Nandini y Sarma (2002) y Rose *et al.* (2002) han registrado para *C. dubia* un promedio de vida de 17 a 43 días. Por ende la supervivencia registrada en el presente estudio se encuentra dentro del intervalo publicado para los géneros *Moina* y *Ceriodaphnia*.

La estrategia de la evaluación generacional de este estudio permitió detectar el efecto gradual que tiene el cobre sobre las poblaciones consecutivas de cladóceros. Durante la primera generación tanto de *M. micrura* como de *C. dubia* el cobre no presentó ningún efecto sobre la tasa de crecimiento poblacional de estos cladóceros. Por el contrario en la cuarta generación de ambas especies, el cobre disminuyó la tasa intrínseca de crecimiento, registrando para *M. micrura* una disminución del 25% y el 27%, mientras que para *C. dubia* sólo la concentración más alta de cobre presentó un efecto adverso disminuyendo un 74% este parámetro demográfico. Generalmente las pruebas de toxicidad crónica solo evalúan la respuesta de una generación expuesta al tóxico sin atender el efecto que concentraciones subletales pueden tener a través de varias generaciones como en el caso del presente estudio. De acuerdo a Van Leeuwen y colaboradores (1985), la exposición generacional de los cladóceros a un tóxico comprende la exposición durante la ovogénesis y embriogénesis de estos y por ende la transferencia del tóxico de madres a neonatos, siendo más realistas los estudios generacionales.

Probablemente ocurrió un mecanismo de bioacumulación del cobre en las especies de cladóceros aquí evaluadas, sin embargo la acumulación del metal en los organismos no fue un factor a determinar en el presente estudio. Rainbow y White (1989) explican que el cobre disuelto en el medio de 0.0032 a 1 mg/L de Cu puede ser acumulado en los cuerpos del anfípodo *Echinogammarus pirloti* y el baláno *Elminius modestus*, sin presentar evidencia de la regulación de este metal. Cada especie responde de diferente manera a las concentraciones de contaminantes y por lo tanto los organismos

acumulan en mayor o menor medida determinados metales tóxicos en sus células; esto lleva a la desaparición de especies, conduciendo a que predominen aquellas que son resistentes a los contaminantes (Kopplin, 2001).

Calow y Sibly (1990) han explicado que el efecto negativo que un tóxico ejerce sobre los organismos puede entenderse de acuerdo al costo metabólico, ya que el estrés causado por un tóxico induce cambios metabólicos que incrementan el consumo de energía, lo que a su vez tiene un efecto adverso en el crecimiento y la reproducción de los organismos. En el presente estudio no se evaluó el gasto energético. Sin embargo, Bossuyt y colaboradores (2005) mencionan que *D. magna* al estar expuesta durante cinco generaciones a 0.100 mg/L de cobre, disminuye sus reservas de energía en comparación con organismos expuestos a concentraciones de cobre más bajas, atribuyendo este hecho a que existe un gasto de energía adicional para desechar el cobre que no es necesario o para purificar internamente su organismo.

Para la sobrevivencia de los microorganismos, es primordial mantener un balance apropiado de los nutrientes esenciales, encontrándose cuatro mecanismos básicos por los cuales los microorganismos resisten a los iones de los metales tóxicos (1) impedir que el ión metálico entre a la célula (2) el ión metálico entra a la célula y posteriormente es expulsado de ella (este mecanismo es el más frecuente), 3) el catión puede unirse a una proteína específica o algún otro compuesto en la superficie o dentro de la célula (4) el ión tóxico puede ser transformado enzimáticamente a un estado que sea menos tóxico (Silver *et. al* 1984).

Existe una gran variación de respuesta de los organismos expuestos a algún tóxico ya que mientras Villarroel y colaboradores (2000) y Sánchez y colaboradores (2000), registraron que *D. magna* expuesta durante dos generaciones a los pesticidas tertradifon y diazion, disminuyeron en ambos casos su supervivencia y reproducción con un mayor impacto en la segunda generación expuesta, a su vez, Sánchez y colaboradores (2004) reportaron que *D. magna* expuesta durante dos generaciones al

herbicida molinate es mayormente afectada en la primera generación. Por el contrario, Rose y colaboradores (2004) reportaron que *C. cf dubia* australiana incrementó progresivamente la tolerancia al tóxico 3,4-dichloroaniline a través de cuatro generaciones sucesivas y a medida que se incrementó la concentración de tóxico se aceleró la presencia.

El grado de tolerancia a un tóxico esta relacionado con la exposición previa de los organismos. Postma y Davids (1995) reportaron que el díptero *Chironomus riparius* expuesto a cadmio durante nueve generaciones sucesivas, disminuyó su reproducción durante las primeras cinco generaciones y a partir de la sexta la incrementó, aunque simultáneamente su supervivencia disminuyó. LeBlanc (1982) por su parte reportó que *D. magna* desarrolló resistencia al cobre solo después de diez generaciones consecutivas expuestas a 0.010 y 0.030 mg/L de cobre. Las especies litorales y bentónicas se encuentran en contacto más directo con los agentes tóxicos, porque estas especies desarrollan sus vidas cerca de los sedimentos de los cuerpos de agua, en donde se encuentra una mayor concentración de tóxico (Newman y McIntosh, 1991) y por lo tanto, es posible que sean más resistentes a la exposición de los metales que las especies pelágicas.

En ciertas concentraciones de tóxico es posible que se presente un estímulo de las poblaciones derivando un efecto de hormesis. La exposición crónica generacional al cobre estimuló positivamente las generaciones intermedias de *M. micrura*. En la segunda generación consecutiva expuesta tanto a 0.035 como a 0.105 mg/L de CuSO_4 se registró un incremento en su tasa de crecimiento poblacional el cual fue del 11% y 13% respectivamente. En la tercera generación expuesta a la concentración más alta de cobre *M. micrura* incremento un 23% su promedio de vida y un 18% su tiempo generacional respecto al control, lo cual puede interpretarse como un efecto de hormesis, que es la es la compensación a la alteración de la homeostasis que ocasiona algún restrictor (Stebbing, 2000). Según Calabrese y Baldwin (2002) han definido este proceso como una respuesta adaptativa caracterizada por respuestas de dosis bifásicas de rasgos cuantitativos generalmente similares con respecto a la amplitud y rango de la

respuesta estimuladora que es directamente inducida o el resultado de procesos biológicos compensatorios siguiendo una interrupción inicial de homeostasis.

Se han reportado respuestas horméticas en varios organismos. Algunas investigaciones como la de Spurgeon y colaboradores (2004) han reforzado este concepto registrando que 0.16 μ Mol/g de cobre o 0.63 μ Mol/g de cadmio incrementan la supervivencia de la lombriz *Lumbricus rubellus* en la primera generación expuesta a cualquiera de estos metales. Zaluzniak y Nugegoda (2005) registraron que una 0.00005 mg/L del herbicida chlorpirifos produce hormesis sobre la segunda generación de *Daphnia carinata*. Sin embargo el concepto de hormesis ha sido limitado durante mucho tiempo, posiblemente porque las investigaciones toxicológicas tradicionalmente han centrado su interés en el estudio de niveles agudos de tóxicos en donde el efecto es letal, sin atender el efecto de bajos niveles de toxicidad crónica. Sin embargo en la última década, el concepto de hormesis ha sido retomado y fuertemente difundido (Calabrese, 2001).

Como se observó en este estudio los organismos acuáticos presentan diferente susceptibilidad a las mismas sustancias tóxicas. De ahí que es necesario conocer más ampliamente la sensibilidad de las especies que se encuentren en México como *M. micrura* y *C. dubia* para comparar su respuesta con la de organismos ya estudiados como *Daphnia* y posiblemente proponer su manejo en evaluaciones toxicológicas y establecer regulaciones, protocolos de manejo y riesgo ambiental.

Algunas líneas de investigación que requieren de mayor atención, son el efecto tóxico del cobre a nivel fisiológico y morfológico identificando las principales rutas de entrada al organismo, evaluando la su posible bioacumulación e identificando los posibles mecanismos de regulación y desintoxicación del zooplancton. Se requiere estudiar más ampliamente las concentraciones de cobre presentes en los cuerpos de agua mexicanos, evaluando el proceso de especiación de este metal en los ambientes naturales a fin de optimizar el establecimiento de límites seguros de contaminantes y atendiendo a su efecto crónico durante la exposición de generaciones sucesivas del zooplancton.

10. CONCLUSIONES

En la fase de toxicidad aguda *M. micrura* fue más sensible al cobre que *C. dubia*, ubicándose ambas especies dentro del intervalo registrado para el zooplancton.

La sensibilidad de *M. micrura* y *C. dubia* a la toxicidad aguda del cobre es mayor que la registrada para *D. magna*.

En las concentraciones evaluadas de cobre, este metal presentó un efecto de hormesis sobre *M. micrura*, pero no así para *C. dubia*.

Existe un efecto acumulativo del cobre sobre los cladóceros *M. micrura* y *C. dubia*, en donde la toxicidad de este metal se incrementa al incrementarse el tiempo de la exposición generacional de los organismos.

11. ANEXO

Para la determinación de las concentraciones reales de cobre, el material utilizado fue lavado con jabón extran al 2% y agua destilada, posteriormente fue colocado en HNO₃ al 5% durante 24h, para eliminar los residuos de metales que pudiera estar presentes e interferir en las mediciones. Transcurrido este tiempo fue enjuagado nuevamente con agua destilada y finalmente se dejó secar.

Se preparó una solución stock de cobre diluyendo 1 g de CuSO₄ en un litro de agua destilada. De esta solución stock, se realizó una dilución 1:1000 en agua destilada, se tomaron 15 ml de esta solución para medir la concentración de cobre total.

En un diseño aparte, se determinó la concentración real de cobre existente en el medio antes y después de exponer durante 24h a *Moina mirura* y *Ceriodaphnia dubia*, para lo cual se colocaron por separado 40 individuos adultos de las especies *M. micrura* y *C. dubia*, en 50ml de medio EPA, a una concentración de 0.4 mg/L de CuSO₄ y con tres replicas para cada especie. Se tomaron muestras del medio antes de colocar a los organismos y después de que los organismos estuvieran en el medio durante 24h, para conocer la concentración real de cobre que quedaba en el medio.

Un diseño similar se realizó para el alga *Scenedesmus acutus*, la cual se colocó en una concentración de 5×10^6 cels /ml en frascos de vidrio, en 50 ml de medio EPA, a una concentración nominal de cobre de 0.4mg/L. Se tomó una muestra de 15 ml de medio en la fase inicial de exposición del alga y se tomó otra muestra del medio después de 24h de exponer el alga al tóxico, a fin de determinar la concentración real de cobre presente en el medio.

Las muestras de cada tratamiento fueron de 15ml y cada una de estas fue colocada en frascos de plástico, a los cuales se les agregó HNO₃ al 3% para evitar que el metal se adhiriera a las paredes de los frascos, cabe destacar que se contó con tres replicas para cada tratamiento

Una vez obtenidas el total de las muestras, se realizó la determinación de la concentración total de cobre de cada muestra, mediante la técnica de espectroscopia de emisión de plasma con un equipo

ICP-OES (inductively coupled plasma optical emission spectroscopy) marca Perkin Elmer. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tratamiento	inicio (mg/L)	24 hrs (mg/L)	diferencia %
Stock	373.467		6
EPA + Cu	0.102		
EPA + Cu + <i>S. acutus</i>	0.094	0.074	21.4
EPA + Cu + <i>M. micrura</i>	0.095	0.074	21.3
EPA + Cu + <i>C. dubia</i>	0.104	0.070	32.9

La concentración real determinada por espectroscopia por emisión de plasma y la concentración real calculada mediante el peso atómico de los elementos de la molécula del sulfato de cobre (CuSO₄), es muy próxima encontrando una variación del 6% lo que nos indica un error de precisión mínimo

Los resultados obtenidos nos muestran que un 21% a un 31% de cobre total probablemente sea captado por los cladóceros y un 21% probablemente sea captado por las algas que sirven de alimento a los cladóceros, el cobre restante no es captado por los organismos quedando suspendido en el medio.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abel P.D. 2000. Water pollution biology. 3rd Imp. Taylor & Francis Group, Gran Bretaña. 286 pp.
- Anónimo. 1985. Methods of measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. USA. Environment Protection Agency EPA/600/4-85/013.
- APHA, AWWA, WEF. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Ed. Washington. USA. 8-1 –8-86.
- Baduo R. 1987. Ecotoxicological testing with *Daphnia*. Mem. Ist. Ital. Hidrobiol. 45:461-482.
- Belanger S.E., Farris J.L. y Cherry D.S. 1989. Effects of diet, water hardness, and population source on acute chronic copper toxicity to *Ceriodaphnia dubia*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 18: 601-611.
- Benider A., Tifnouti A. y Pourriot R. 2002. Growth of *Moina macrocopa* (Straus 1820) (Crustacea, Cladocera): influence of trophic conditions, population density and temperature. Hydrobiology 468:1-11p
- Borowitzka M.A. y Borowitzka L.J. 1988. Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press, London.
- Bossuyt B.T.A., Escobar Y.R. y Janssen C.R. 2005. Multigeneration acclimation of *Daphnia magna* Straus to different bioavailable copper concentration. Ecotoxicol. and Environ. Saf. 61: 327-336.
- Bossuyt B.T.A. y Janssen C.R. 2004. Influence of multigeneration acclimation to copper on tolerance, energy reserves, and homeostasis of *Daphnia magna* Straus. Environ. Toxicol. y Chem. 23: 8 2029- 2037.
- Calabrese J.E. 2001. The future of hormesis: where do we go from here?. Critical reviews in toxicology (31) 4-5: 637-648.
- Calabrese E.J., Baldwin L.A. 2002. Defining hormesis. In Chapman P.M. 2002. Ecological risk assessment (ERA) and hormesis. The Science of the total Environ 288: 131-140.

- Calow P. 1998. Handbook of ecotoxicology. Blackwell Science. Publ. London.
- Calow P. y Sibly R.M. 1990. A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Funct. Ecol.* 4: 283-288.
- Cervantes C. y Moreno Sánchez R. 1999. Contaminación ambiental por metales pesados. AGT Editor. México. 157 pp.
- Chapman P.M. 2002. Ecological risk assessment (ERA) and hormesis. *The Science of the total Environ* 288: 131-140
- Diario Oficial. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales; Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996; SEMARNAP: México, 1997; 68-85p.
- Dodson S.I. y Frey DG. 1991. Cladocera and other Branchiopoda. Ecology and Classification of North American freshwater invertebrates. Academic Press. Inc., USA. 723-786pp.
- Ferrando M.D., Sancho E. y Andreu-Moliner E. 1996. Accumulation of tetradifon in algae (*Nannochloris oculata* and the cladoceran, *Daphnia magna*). *Bull. Environ. Toxicol.* 57: 139-145
- Finney D.J. 1971. Probit Analysis. 3er ed. Cambridge University Press. London. 333 pp.
- Elías-Gutiérrez M., Ciro-Pérez J., Suárez-Morales E. Y Silva-Briano M. 1999. The freshwater cladocera (orders Ctenopoda and Anomopoda) of Mexico, with comments on selected taxa. *Crustaceana* 72(2):171-186.
- Gotelli N.J. 1995. A primer of ecology. Sinauer Associates Inc. USA. 206 pp.
- Goulden C.E. 1968. The systematics and evolution of the Moinidae. *Trans. Amer. Philos. Soc. N.S.V.* 58(6) 97p.
- Gulati R.D. y Demott W. 1997. The role food quality for zooplankton: remarks on the state-of-the-art, perspectives and priorities. *Fresh. Biol.* 38: 753-768

- Harmon S.M., Specht W.L. y Chandler G.T. 2003. A comparison of the daphnids *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia ambigua* for their utilization in Routine toxicity testing in the Southeastern United States. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45: 79-85.
- Hauri F.J.J. 2001. Measurement and manipulation of copper speciation y toxicity in urban runoff, acid mine drainage y contaminated groundwater. Tesis of Doctor of Philosophy in Civil and environmental engineering. University of California. USA.
- Kim S.D., Gu M.B., H. Allen H.E., Cha, D.K. 2001. Physicochemical factors affecting the sensitivity of *Ceriodaphnia dubia* to copper. Environ. Monitoring and Assesment 70: 105-116.
- Kooplin M. 2001. Toxicología ambiental. Evaluación de riesgos y restauración ambiental. USA.
- Krebs C.J. 1985. Ecology, The experimental analysis of distribution and abundance. 3^a ed. Harper and Row, New York. 800 pp.
- LeBlanc G.A. 1982. Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (Straus) to environmental pollutants. Environ. Pollution (series A) 27: 309-322.
- Mangas-Ramírez E., Sarma S.S.S. y Nandini S. 2001. Acute and chronic toxicity of ammonium chloride to the cladoceran *Daphnia pulex* leydig in relation to algal food density. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67: 834-840
- Mangas-Ramírez E., Sarma S.S.S. y Nandini S. 2002. Combined effects of algal (*Chlorella vulgaris*) density y ammonia concentration on the population dynamics of *Ceriodaphnia dubia* y *Moina macrocopa* (Cladocera). Ecotoxicol. and Environ. Saf. 51: 216-222.
- Manson C.F. 1984. Biología de la contaminación del agua dulce. Alambra. España. 289 p.
- Margalef R. 1983. Limnología. Omega, España. 783p.
- Moreno-Garrido I., Lubián L.M. y Soares A.M. 1999. Growth differences in cultured populations of *Brachionus plicatilis* Mueller caused by heavy metals stress as function of microalgal diet. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 63: 392-398.

- Munger C., Hare L., Craig A. y Pierre-Mathieu C. 1999. Influence of exposure time on the distribution of cadmium within the cladoceran *C. dubia*. *Aquatic Toxicol.* 44: 195-200.
- Nandini S. y Sarma S.S.S. 2000. Life table demography of four cladoceran species in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) density: *Hidrobiologia* 435:117-126
- Nandini S y Sarma S.S.S. 2002 a. Competition between *Moina macrocopa* and *Ceriodaphnia dubia*: a life table demography study. *International Review of Hydrobiology* 87: 85-95.
- Nandini S. y Sarma S.S.S. 2002. Population growth of some genera of cladocerans (Cladocera) in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) levels. *Hydrobiologia* 00:1-9.
- Negrea S., Botnariuc N., Dumont y H.J. 1999. Phylogeny, evolution and classification of the *Branchiopoda* (Crustacea). *Hydrobiologia.* 412: 191-212.
- Newman M y McIntosh A. 1991. Trace metals in freshwater sediments: A review of the literature and assessment of research needs. Edit Board, USA. 243-260p.
- Pesson P. 1979. La contaminación de las aguas continentales, incidencias sobre las biocenosis acuáticas. Mundi-prensa, Madrid España. 470 pp.
- Petrusek A. 2002. *Moina* (crustacea: Anomopoda, Moinidae) in the Czech Republic: review. *Acta Soc. Zool. Bohem.* 66: 123-220.
- Pianka E.R. 1988. *Evolutionary ecology*. Harper y Row, Pub. Inc. 468 pp.
- Picazo-Paez E.A. 2003. Interacción entre la temperatura, el nivel de alimento y metales pesados (cobre y zinc), en los parámetros demográficos del cladóceros *Moina macrocopa* Goulden. Tesis Licenciatura. UNAM Campus Iztacala. Edomex. México. 55pp.
- Postama J.P. y Davids C. 1995. Tolerance induction and life cycle changes in cadmium-exposed *Chironomus riparius* (Diptera) during consecutive generations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30:195-202.

- Rainbow P.S. y White S.L. 1989. Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, and an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia* 174: 245-262.
- Rico-Martínez R., Legaspi-Pérez A., Quintero-Díaz G.E., Rodríguez-Martínez M.G., Hernández-Rodríguez M.A. y Zaragoza-Almaraz J.E. 1998: Effects of copper addition to laboratory maintained microcosms of Presidente Calles reservoir organism (Aguascalientes, Mexico). *Aquatic Ecosystem Health and Management* 1: 323-332.
- Rosales-Hoz L. y Carranza-Edwards A. 1998. Heavy Metals in Sediments from Coatzacoalcos River, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 553-561.
- Rosales-Hoz L, Carranza-Edwards A, López-Hernández M. 2000. Heavy metals in sediments from of a large, turbid tropical lake affected by anthropogenic discharges. *Environ. Geology* 39 (3-4) 376-383.
- Rose R.M. y Warne M.StJ. y Lim R.P. 2004. Sensitivity of offspring to chronic 3,4-dicloroaniline exposure varies with maternal exposure. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 58: 405-412.
- Ruppert E.E. y Barnes R.D. 1996. *Zoología de los invertebrados*. 6ª ed., McGraw-Hill. México. 757-762pp.
- Sánchez M., Ferrando M.D., Sancho E. y Andreu-Moliner E. 2000. Physiological perturbations in several generations of *Daphnia magna* Straus exposed to diazinon. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 59: 316-323.
- Sánchez M., Andreu-Moliner E. y Ferrando M.D. 2004. Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* to the herbicide molinate. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 46: 87-94.
- Sarma S.S.S. 1996. Rotifers culture system. In: International workshop in rotifer culture system. UNAM Campus Iztacala, México. 28-56 pp.

- Sarma S.S.S., Ramírez-Pérez T. y Nandini S. 2000. Comparison of the sensitivity of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera) to selected heavy metals under low and high food (*Chlorella vulgaris*) levels. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 64: 735-739.
- Sarma S.S.S., Larios-Jurado P. y Nandini S. 2001. Effect of three food types on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). Rev. Biol. Trop. 49(1):77-84.
- Silver S y Williams JW. 1984. Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. Enzyme. Microb. Technol. Grau. 6: 531-537
- Smolyakov B.S., Zhigula M.V., Ryzhikh A.P. y Sinitsyna E.V. 2004. Copper (II) Speciation in a Freshwater Ecosystem. Water Resources. 31:1 55-63.
- Spurgeon D.J., Svendsen C., Kille P., Morgan A.J. y Weeks J.M. 2004. Responses of earthworms (*Lumbricus rubellus*) to copper and cadmium as determined by measurement of juvenile traits in a specifically designed test system. Ecotoxicol. and Environ. Saf.57: 54-64.
- Stebbing A.R.D. 2000. Maia hypothesis, growth control and toxicology. Hum. Ecol. Risk Assess. 6: 301-311.
- Stearns, S.C., 1976. Life history tactics: a review of ideas. Q. Rev. Biol. 51: 3-47.
- U.S.EPA. 1985. Ambient Water Quality Criteria for copper-1984,EPA 440/5-84-031, Washington, D.C.
- Van Leeuwen C.J., Luttmer W.J. y Griffioen P.S. 1985. The use of cohorts y populations in chronic toxicity studies with *Daphnia magna*: a cadmium example. Ecotoxicol. Environ. Saf. 9: 26-39
- Villareal-Treviño C.M., Obregón-Morales M.E., Lozano Morales J.F. y Villegas-Navarro A. 1986. Bioaccumulation of lead, copper, iron and zinc by fish in a Transect of the Santa Catarina River in Cadereyta Jimenez Nuevo Leon, Mexico. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 37:395-401.

- Villaroel M.J., Ferrando M.D., Sancho E. y Andreu E. 2000. Effects of tetradifon on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to the pesticide. *Aquatic Toxicol.* 49: 39-47.
- Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M. y Peakall D.B. 1998. Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis. Gran Bretaña. 321 pp.
- Whitten K.W., Gailey K.D. y Davis R.E. 1992. Química general. Mc Graw-Hill Interamericana, México. 884
- Wong C.K. 1992. Effects of chromium, copper, nickel and Zinc on survival and feeding of the cladocera *Moina macrocopa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49:593-599.
- Wong C.K. (1993). Effect of chromium, copper, nickel and zinc on longevity y reproduction of the cladocera *Moina macrocopa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 633-639
- Zalizniak L. y Nugegoda D. 2006. Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of *Daphnia carinata*. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 0:00-00
- Zou E. y Bu S. 1994. Acute toxicity of copper, cadmium and zinc to the water flea, *Moina irrasa* (Cladocera). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 742-748.
- Zou E. 1997. Effects of sublethal exposure to zinc chloride on the reproduction of water flea, *Moina irrasa* (Cladocera). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58: 437-441.