



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

TESIS

Implementación de *Alona cf. guttata* Sars, 1862 (Chydoridae: Aloninae) como organismo modelo para pruebas de toxicidad.

PRESENTA

Olga Cristal Osorio Treviño

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

TUTORES

Dr. Roberto Rico Martínez
Departamento de Química
Universidad Autónoma de Aguascalientes
CO-TUTOR

Dr. Mario Alberto Arzate Cárdenas
Departamento de Química
Universidad Autónoma de Aguascalientes
CO-TUTOR

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Elsa Marcela Ramírez López
Departamento de Química
Universidad Autónoma de Aguascalientes

Aguascalientes, Ags., 15 de Noviembre de 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **OLGA CRISTAL OSORIO TREVIÑO** con ID 187507 quien realizó la tesis titulada: **IMPLEMENTACIÓN DE *Alona* cf. *guttata* Sars, 1862 (Chydoridae: Aloninae) COMO ORGANISMO MODELO PARA PRUEBAS DE TOXICIDAD**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 28 de Octubre de 2016.

Dr. Roberto Rico Martínez

Dr. Mario Alberto Arzate Cárdenas

Tutores de tesis

Vo. Bó. Dr. Elsa Marcela Ramírez López
Miembro del Comité Tutorial

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaria de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejero Académico (Dr. José Francisco Morales Domínguez -Para área terminal Biotecnología Vegetal y Dr. Martín Gerardo Rodríguez -Para área terminal Toxicología)
c.c.p.- Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch - Secretario Técnico

OLGA CRISTAL OSORIO TREVIÑO
MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA TOXICOLOGÍA
PRESENTE.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "Implementación de *Alona cf. guttata Sars, 1862 (Chydoridae: Aloninae)* como organismo modelo para pruebas de toxicidad", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

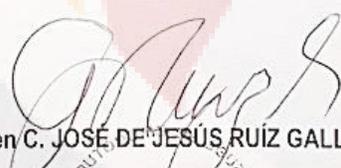
Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 31 de octubre de 2016

"Se lumen proferre"

EL DECANO



M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme guiado a lo largo de mi vida y darme fortaleza en los momentos difíciles, le agradezco por el conocimiento que me ha permitido desarrollar.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por brindarme una oportunidad incomparable y el apoyo recibido.

Al Dr. Roberto Rico Martínez por su dirección y asesoría en éste trabajo, por compartir sus conocimientos, y brindarme su completo apoyo a lo largo de la realización del proyecto.

Al Dr. Mario Alberto Arzate Cárdenas por su compromiso y entrega asesorando y guiando el proyecto, por brindarme su apoyo, por haber compartido conmigo sus conocimientos y por la motivación para culminar este proyecto.

A la Dra. Elsa Marcela Ramírez López, por su asesoría y apoyo durante la realización de éste proyecto.

Al Dr. Gustavo Emilio Santos Medrano, por sus consejos y observaciones para enriquecer esta tesis.

A M.C. Nancy Yadira Meza Treviño y M.C. Susana Saucedo Ríos por compartir conmigo sus conocimientos, por sus consejos y por brindarme su apoyo y amistad.

Agradezco a todos mis compañeros y amistades de la Universidad Autónoma de Aguascalientes que de forma directa e indirecta enriquecieron este proyecto.

DEDICATORIAS

A mis padres Olga Treviño Fernández y Porfirio Osorio Toledo, por ser mi ejemplo a seguir, por brindarme su paciencia comprensión y amor a lo largo de mi vida y enseñarme valores que me han permitido llegar a este punto en mi trayectoria académica.

A mi hermano Roberto Osorio Treviño, por ser el ejemplo de un hermano mayor, por haberme brindado sus mejores consejos en momentos difíciles y por su amor.

A mi cuñada Dolores Urania Balderas Rodríguez por siempre tener un palabra de amor hacia mi, por motivarme a cumplir mis metas y creer en mi.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA	9
1.2 PLANCTON	11
1.3 CLADÓCEROS Y SU IMPORTANCIA	12
1.3.1 FAMILIA CHYDORIDAE	14
1.3.1.1 GÉNERO <i>Alona</i>	17
1.3.1.1.1 <i>Alona cf. gutatta</i>	19
1.4 TABLA DE VIDA	20
1.5 PRUEBAS DE TOXICIDAD	21
1.5.1 RESPUESTAS AGUDAS Y CRÓNICAS	22
1.6 TOXICIDAD DE METALES	22
1.6.1. PLOMO	23
1.7 TOXICIDAD DE PESTICIDAS	24
1.7.1 VINCLOZOLIN	26
1.7.2 DELTAMETRINA	27
1.8 BIOMARCADORES	28
1.8.1 ASIGNACIÓN DE ENERGÍA	29
2. ANTECEDENTES	30
2.1 ADAPTACIÓN DE ORGANISMOS	30
2.2 TABLA DE VIDA	30
2.3 DELTAMETRINA	31
2.4 PLOMO	32
2.5 REASIGNACIÓN DE ENERGÍA	32
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVO GENERAL	34
6. OBJETIVOS PARTICULARES	35
7. METAS	35
8. MATERIALES Y MÉTODOS	36
8.1 MANTENIMIENTO DE LA CEPA	37
8.2 CULTIVO DE MICROALGAS	38
8.3 TABLA DE VIDA	38
8.4 PRUEBAS DE TOXICIDAD	39

8.4.1. TOXICIDAD AGUDA	39
8.4.2. TOXICIDAD CRÓNICA	40
8.5 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES: REASIGNACIÓN DE ENERGÍA	41
8.5.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE PROTEÍNAS....	41
8.5.2. DETERMINACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO TOTALES.....	42
8.5.3. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES	42
8.5.4. CONTENIDO CALÓRICO	43
8.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	43
9. RESULTADOS	43
9.1 TABLA DE VIDA	43
9.1.1 PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS	43
9.1.2 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA	47
9.2 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS AGUDAS	49
9.2.1. PLOMO.....	49
9.2.2 DELTAMETRINA.....	51
9.2.3 VINCLOZOLIN	53
9.3. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CRÓNICAS.....	53
9.3.1. PLOMO.....	53
9.3.2. DELTAMETRINA.....	56
9.4 RESULTADOS DE LOS BIOMARCADORES.....	61
9.4.1 PLOMO.....	61
9.4.2 DELTAMETRINA.....	63
9.4.3 CE ₅₀ PARA PLOMO Y DELTAMETRINA.....	65
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	66
10.1 TABLA DE VIDA	66
10.2 PRUEBAS AGUDAS.....	68
10.2.1 PLOMO.....	68
10.2.2 DELTAMETRINA.....	68
10.3 PRUEBAS CRÓNICAS	69
10.3.1 PLOMO.....	69
10.2.2 DELTAMETRINA.....	70
10.4 BIOMARCADORES.....	71
11. CONCLUSIONES	72
12. GLOSARIO	74
13. REFERENCIAS	76
14. ANEXO.....	91
ANEXO A.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Características principales de la familia Chydoridae.....	9
Figura 2. Morfología y filogenética de la familia Chydoridae.....	10
Figura 3. Estructura externa de <i>Pleuroxus trigonellus</i> (Cydoridae).....	11
Figura 4. <i>Alona</i> cf. <i>guttata</i> Sars, 1862, de Aguascalientes, México. Morfología externa.....	14
Figura 5. <i>Alona</i> cf. <i>guttata</i> Sars, 1862 de Aguascalientes, México. Detalles morfológicos.....	15
Figura 6. Vinclozolin.....	21
Figura 7. Deltametrina.....	22
Figura 8. Curvas de supervivencia según las diferentes temperaturas de exposición de los organismos. Utilizando la microalga <i>Nannochloropsis occulata</i>	43
Figura 9. Curvas de regresión logística Logit y regresión de ajuste lineal Probit para exposición a Plomo II.	45
Figura 10. Curvas de regresión logística logit y regresión de ajuste lineal Probit para exposición a Deltametrina.....	47
Figura 11. Resultados de exposición crónica a Plomo II de <i>Alona</i> cf. <i>guttata</i>	50
Figura 12. Curva de supervivencia de <i>Alona</i> cf. <i>guttata</i> para el tóxico Plomo.....	51
Figura 13. Resultados de exposición crónica a Deltametrina de <i>Alona</i> cf. <i>guttata</i>	54
Figura 14. Gráfica de supervivencia <i>Alona</i> cf. <i>guttata</i> para el tóxico Deltametrina.	55
Figura 15. Contenido de moléculas A- Proteínas, B- Lípidos, C- Carbohidratos y D- Contenido calórico, por exposición a Plomo II.....	57
Figura 16. Contenido de moléculas A- Proteínas, B- Lípidos, C- Carbohidratos y D- Contenido calórico por exposición a Deltametrina....	59

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Parámetro demográficos y sus ecuaciones.....	15
Tabla 2. Tabla de Vida utilizando <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> como alimento.....	40
Tabla 3. Tabla de Vida utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como alimento.....	40
Tabla 4. Tabla de Vida utilizando <i>Nannochloropsis oculata</i> como alimento.....	41
Tabla 5. Tabla de Vida utilizando <i>Chlorella vulgaris</i> como alimento.....	42
Tabla 6. Resumen de resultados de pruebas agudas con <i>Alona</i> cf. <i>guttata</i> por exposición a Plomo II.....	46
Tabla 7. Resumen de resultados de pruebas agudas con <i>Alona</i> cf. <i>guttata</i> por exposición a Deltametrina	48
Tabla 8. Concentraciones Efectivas Medias (EC ₅₀) de los tóxicos plomo y deltametrina en Carbohidratos, Lípidos y Proteínas. Mas error estándar.....	60
Tabla 9. Concentraciones Efectivas 10 y 90 (EC ₁₀ , EC ₉₀) de los tóxicos plomo y deltametrina en Carbohidratos, Lípidos y Proteínas.....	60

RESUMEN

Alona cf. guttata pertenece a la familia Chydoridae, es un organismo litoral que habita en aguas epicontinentales y se ha encontrado en regiones tropicales en diferentes partes del mundo. El objetivo del presente estudio fue establecer las condiciones óptimas para el cultivo y reproducción de *Alona cf. guttata* en condiciones de laboratorio para su implementación de pruebas de toxicología acuática.

El análisis de la tabla de vida estableció la colecta de información sobre su reproducción y longevidad, calculando los parámetros demográficos como es el tiempo de vida media, tiempo generacional, fecundidad específica por edad, tasa neta de reproducción y tasa de crecimiento poblacional. Considerando los factores temperatura (20 y 25 °C), tipo de sustrato (artificial y suelo de jardín), tipo de alimento (*S. cerevisiae*, *P. subcapitata*, *N. occulata* y *C. vulgaris*) y la concentración de alimento (0.25×10^6 , 0.5×10^6 , 1×10^6 , 2×10^6 , 4×10^6 , y 8×10^6 células/mL). Siendo el mejor tratamiento el uso de la microalga *N. occulata* a cualquiera de las temperaturas y sustratos probados, en concentraciones de 2×10^6 , 4×10^6 células/mL.

Se realizaron pruebas de toxicidad aguda con observaciones a 48 h, utilizando los tóxicos plomo y deltametrina, calculándose la CL_{50} respectiva para cada tóxico, siendo que para la exposición a plomo a 20 y 25 °C fue de: 1.5 ppm, y para deltametrina= 0.1 y 0.08 ppm para 20 y 25 °C respectivamente. La toxicidad crónica para plomo y deltametrina se determinó mediante un análisis tipo tabla de vida, utilizando concentraciones de exposición para plomo en el rango de 0.02 a 0.32 ppm; y para deltametrina de 0.001 a 0.02 ppm. La respuesta de supervivencia de *Alona cf. guttata* por exposición a plomo se observó en un rango de 8 a 12 días. Mientras que en la intoxicación por deltametrina se mantuvo en un rango de 5 y 10 días. La intoxicación modificó la reproducción del organismo, disminuyendo la cantidad de neonatos en un mínimo del 50%, por ciclo reproductivo.

Alona cf. guttata demostró ser un organismo sensible a plomo y deltametrina.

ABSTRACT

Alona cf. *guttata* belongs to the Chydoridae family, is a coastal organism that inhabits epicontinental waters and has been found in tropical regions in different parts of the world. The objective of the present study was to establish optimal conditions for culture and reproduction of *Alona* cf. *guttata* under laboratory conditions for the implementation of aquatic toxicology tests.

The analysis of the life table established the collection of information about its reproduction and longevity, calculating the demographic parameters such as the average lifetime, generational time, age specific fertility, net reproductive rate and population growth rate. Considering temperature factors (20 and 25 °C), type of substrate (artificial and garden soil), type of food (*S. cerevisiae*, *P. subcapitata*, *N. occulata* and *C. vulgaris*) and feed concentration (0.25×10^6 , 0.5×10^6 , 1×10^6 , 2×10^6 , 4×10^6 , y 8×10^6 cells / mL). The best treatment is the use of the *N. occulata* microalgae at any of the temperatures and substrates tested, in concentrations of 2×10^6 , 4×10^6 cells / mL.

Acute toxicity tests were carried out with 48 hour observations using toxic lead and deltamethrin, and the respective LC₅₀ was calculated for each toxicant. For lead exposure at 20 and 25 °C it was: 1.5 ppm and for deltamethrin = 0.1 And 0.08 ppm for 20 and 25 ° C respectively.

Chronic toxicity for lead and deltamethrin was determined using a life table analysis, using exposure concentrations for lead in the range of 0.02 to 0.32 ppm; And for deltamethrin from 0.001 to 0.02 ppm. The survival response of *Alona* cf. *guttata* by exposure to lead was observed in a range of 8 to 12 days. While in deltamethrin intoxication was maintained in a range of 5 and 10 days. Intoxication modified the reproduction of the organism, reducing the number of infants in a minimum of 50%, per reproductive cycle.

Alona cf. *guttata* proved to be a lead-sensitive organism and deltamethrin.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación es un problema serio que repercute de manera negativa en la integridad de los ecosistemas, así como en sus funciones naturales (Cairns y McCormick, 1992). Desafortunadamente el paso del hombre sobre la tierra ha generado perturbaciones con consecuencias que van desde las más pequeñas, hasta consecuencias a niveles globales (Wolman, 1968). La contaminación del agua actualmente refleja uno de los problemas ambientales de prioridad a nivel global, lo que influye en la disponibilidad de este recurso de vital importancia y que amenaza el desarrollo y la persistencia de poblaciones humanas en diferentes regiones del mundo, principalmente en los países en vías de desarrollo (Jaramillo-Juárez, 2008).

Los cuerpos de agua superficiales pueden llegar a estar contaminados con muchos tóxicos antropogénicos, por lo que es necesario conocer los efectos de estos químicos para preservar los ecosistemas acuáticos. Entre estos tóxicos, la importancia de los pesticidas es grande, ya que estos son liberados de manera intencional en el ambiente siendo diseñados para matar organismos (Hanazato, 2001). Además, las actividades humanas son capaces de alterar la distribución de metales pesados en el ambiente, convirtiéndolos en contaminantes que pueden alterar sistemas acuáticos (INECC, 2012).

En México, gran parte de la economía depende de la industria minera. La extracción de minerales genera una cantidad importante de metales pesados, además de producir otros contaminantes que pueden liberarse al ambiente cuando no existe un control adecuado de los residuos mineros (González-Sánchez et al., 2010). La agricultura en México es considerada como el sector productivo más importante desde un punto vista económico y social (FAO, 2016), lo que implica que miles de plaguicidas se puedan encontrar de manera individual o combinados en suelos y cuerpos de agua del país (INECC, 2012). Es por esto, que los biomonitoreos ambientales han tomado gran importancia para conocer la calidad del agua, y proteger este recurso natural de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

contaminantes que llegan a diversos cuerpos acuáticos ya sea por descargas de aguas tratadas de uso industrial, aguas utilizadas en agricultura, o efluentes urbanos (Lee et al., 2004). Las pruebas de toxicidad son útiles para la evaluación del efecto de las sustancias en organismos sensibles o estructuras biológicas que pertenecen a otros niveles organizacionales (Olguín, 2004). Además, las pruebas de toxicidad permiten establecer los límites permitidos para los distintos contaminantes y poder comparar qué tan sensible es una especie a un tóxico, en diferentes condiciones (Velandi-guaunque et al., 2010).

El zooplancton ha sido frecuentemente utilizado en estudios ecotoxicológicos por su alta sensibilidad a químicos tóxicos; además de su importancia en la cadena alimenticia. Y estas respuestas brindan información sobre el impacto relativo que se tiene en un ecosistema (Hanazato, 2001).

Dentro del subfilo Crustacea, existen un grupo de organismos denominados cladóceros (Días-Báez et al., 2004; Elías-Gutiérrez et al., 2008), y dentro de este grupo se encuentra clasificado el género *Alona*; algunos de estos microcrustáceos se han encontrado de manera endémica en cuerpos de agua en Aguascalientes, incluyendo el género y especie *Alona* cf. *guttata*. Los cladóceros se alimentan de microalgas, bacterias y materia orgánica, y su reproducción es principalmente asexual por partenogénesis (Muñoz-Peñuela, 2013).

Los cladóceros son microcrustáceos, que llegan a medir menos de 1 mm de longitud, aunque algunos pueden tener un tamaño de hasta 3 mm (Gliwicz, 1990; Langdon, 1965), son organismos con gran relevancia ecológica ya que forman parte de la cadena trófica acuática, y además son ampliamente estudiados y utilizados para pruebas toxicológicas (CONABIO, 2008).

En biomonitoreos, los ensayos toxicológicos son los más usados para conocer el estado de un cuerpo acuático, el cladóceros *Daphnia magna* Straus es el más comúnmente usado internacionalmente para estos ensayos por ser de fácil mantenimiento en el laboratorio y tener un ciclo de vida corto (Núñez

et al., 2005).

1.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA

Los cuerpos de aguas naturales como los ríos, pueden ser sometidos a cambios climáticos y por esta razón la calidad y condición del agua es variable en función del tiempo y de otros factores ambientales; además, el agua puede ser afectada de manera antropogénica llegando a cambiar irreversiblemente sus características y propiedades (Guzmán-Colis et al., 2011). Una de las principales formas de contaminación de los sistemas acuáticos se debe a descargas de aguas contaminadas (Jaramillo-Juárez et. al, 2008).

Existen diferentes medidas de análisis que permiten monitorear la calidad del agua donde se miden parámetros como los fisicoquímicos y microbiológicos, con el fin de poder interpretar el estado y calidad del agua (Guzmán-Colis et al., 2011).

Los efectos producidos por contaminantes tóxicos en los sistemas acuáticos pueden variar de acuerdo a la duración de la exposición y la cantidad del tóxico; el criterio de riesgo se establece de acuerdo a niveles permisibles del contaminante y estos niveles se determinan utilizando diferentes especies de organismos acuáticos. Se miden los efectos que tienen los contaminantes sobre los organismos como: tasa de crecimiento, efectos en su comportamiento, fisiología y si los organismos exhiben tolerancia al tóxico (Fleeger, 2003).

Existen diversas normativas nacionales e internacionales involucradas en la regulación de la calidad del agua, que describen métodos y parámetros de prueba, además de los procedimientos de ensayos toxicológicos. En México, las normas oficiales mexicanas NOM-001-SEMARNAT-1996, NOM-002-SEMARNAT-1996 y NOM-003-SEMARNAT-1997 establecen los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal y para las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aguas residuales tratadas que se reúnen en servicios al público, respectivamente. Además, la norma mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010 evalúa la toxicidad aguda utilizando al cladóceros *Daphnia magna*, Straus (Crustacea: Cladocera); esta norma que fue adaptada a partir del método de prueba 2021.0 descrito por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (USEPA, 2002b).

Entre las agencias gubernamentales que emiten tratados, lineamientos y metodologías para evaluar la calidad del agua, las más conocidas en nuestro país provienen de Norteamérica. En Canadá, La Agencia de Medio Ambiente propuso un método biológico de referencia para la determinación en efluentes de letalidad aguda utilizando a *Daphnia magna* (EC, 1990). En Estados Unidos, los Métodos Estándares para la examinación de aguas y aguas residuales, desde principios de siglo XX han sido las técnicas de análisis de agua más representativas en dicho país; los Métodos Estándares son un conjunto de publicaciones de la Asociación Americana de Salud Pública (APHA), La Asociación Americana de Obras de Agua (AWWA), y la Federación de Agua de Medio Ambiente (WEF) (American Public Health Association, 1992).

La Agencia de Protección Ambiental ha emitido diferentes tratados donde se describen metodologías y lineamientos de calidad para aguas, como lo es el código de regulación federal 40, parte 131, donde se enlistan los requerimientos de cumplimiento de estándares de calidad de agua (USEPA, 2000b). Así como métodos analíticos para evaluar toxicidad aguda en organismos de agua dulce y marinos para efluentes y aguas receptoras (USEPA, 2002b), y métodos para evaluar toxicidad crónica en organismos de agua dulce (USEPA, 2002a).

Existen otra serie de normativas para calidad del agua, estas se encuentran en el catálogo de estándares de las Normas ISO que describen procedimientos para calidad de agua y aguas residuales. Entre los procedimientos del comité técnico, se encuentran los métodos de prueba para

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

determinación de movilidad en *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea), que es una prueba de toxicidad aguda (ISO 6341, 2012) además de incluir el procedimiento para la prueba crónica utilizando el mismo organismo de prueba (ISO 10706, 2000).

1.2 PLANCTON

El plancton es la comunidad de organismos que viajan a la deriva entre las corrientes, es decir, son organismos sésiles o de baja capacidad natatoria. Sus movimientos se producen verticalmente y cuando lo hacen horizontalmente son arrastrados por la corriente del agua; se distinguen dos tipos de plancton: zooplancton (plancton animal) y fitoplancton (organismos que realizan fotosíntesis) (Barreiro-Güemes, 2003).

El zooplancton está compuesto por una mezcla de especies distintas de organismos con diferente clasificación taxonómica, donde los organismos difieren en cuanto a sus hábitos y estrategias de reproducción (Santos et al., 2010). Desempeña un papel muy importante dentro de los ecosistemas acuáticos ya que uno de sus alimentos principales son las microalgas y materia orgánica que se encuentra como partículas; además, el zooplancton es el principal alimento de larvas y juveniles de peces (Oliveros, 1980).

El zooplancton, en particular los rotíferos y los cladóceros, son capaces de incrementar su densidad en gran manera basándose en dietas de materia orgánica y bacterias (Muñoz-Peñuela et al., 2013); La densidad del alimento, la temperatura del ambiente, así como la luz, juegan un papel importante en el desarrollo de los organismos, su locomoción y sus ciclos reproductivos (Nandini et al., 2004).

El fitoplancton está formado por microalgas y cianobacterias que son en su mayoría fotosintéticas, es por esta característica que este tipo de plancton es catalogado como productor primario. Cabe mencionar que el fitoplancton participa además en ciclos biogeoquímicos como los del carbono, oxígeno,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hidrógeno, nitrógeno, fósforo, silicio y otros elementos como azufre, sodio, cloro, potasio, hierro y otros metales traza (Hernández-Becerril, 2014). El fitoplancton de los océanos del mundo conforma poco más del 1% del carbono global correspondiente a plantas. Sin embargo, estos organismos fijan entre 30 y 50 billones de toneladas métricas de carbón anualmente, lo que representa el 40% del total de carbón, esto muestra la importancia del fitoplancton fotosintético en los ciclos biogeoquímicos (Falkowski, 1994). De acuerdo a la biología marina, la producción primaria de fitoplancton es el pilar de los ecosistemas pelágico y bentónicos, y determinan la tasa de acumulación de materia orgánica en los sedimentos (Chávez-Francisco, 2014).

Los medios de cultivo utilizados para cladóceros pueden ser clasificados como sintéticos o naturales, con el fin de que puedan cultivarse en buenas condiciones y por períodos de tiempo largos. La composición del agua dulce natural puede variar debido a cambios estacionales y geográficos, y contener compuestos resultantes de contaminación por lo que se prefiere el uso de medios artificiales (Klütitgen et al.,1994).

1.3 CLADÓCEROS Y SU IMPORTANCIA

Dentro del subfilo Crustacea se agrupa a la subclase Branchiopoda, la cual tiene cuatro órdenes: *Cladocera*, *Anostraca*, *Notostraca* y *Conchostraca*. El orden *Cladocera* es un grupo de microcrustáceos branquiópodos que pueden habitar casi cualquier cuerpo de agua dulce (Korhola y Rautio, 2001). Existen diferentes patrones de distribución y dispersión a nivel mundial para las especies de cladóceros y copépodos (Haevel y Medley, 2006).

La transferencia de energía dentro de las redes tróficas entre los ecosistemas acuáticos debe su importancia a organismos como los cladóceros, ya que estos son utilizados como alimento por otros organismos superiores como peces ya que tienen un alto contenido nutricional; se han realizados diferentes estudios sobre su ciclo de vida con el fin de comprender más sobre su importancia en los ecosistemas acuáticos. (Dos Santos-Silva, 2014).

Los cladóceros tienen un ciclo de vida corto, cuya duración puede fluctuar dependiendo de la temperatura, entre los 13 a 15 días (p.ej. en *Moina micrura* Kurz, 1874), a más de 60 días (p.ej. en *Daphnia magna* Straus) (Martínez-Jerónimo et al., 1994). El ciclo de vida de los cladóceros se caracteriza por estar dominado por hembras que se reproducen de manera asexual a través de un fenómeno denominado partenogénesis, dando origen a más hembras (Smirnov, 1996). En cierto momento y generalmente como resultado de un estímulo ambiental, que puede ser una reducción del fotoperiodo, alimento o temperatura, las hembras partenogenéticas producen un tipo de huevo diferente, que si no es fecundado dará origen a machos (Sinev y Kotov, 2004).

En caso de ser fecundados, estos huevos originan una estructura de resistencia que puede fusionarse con el caparazón bivalvo que cubre a estos organismos, que se denominada efipio, que permanecerá en el sedimento mientras las condiciones ambientales no sean óptimas (Elías-Gutiérrez et al., 2008).

La mayoría de los cladóceros tienen apéndices con una estructura en forma de hoja como aplanada y los apéndices coxales llevan un epipodito aplanado. Además de su papel en la respiración, los apéndices se utilizan para la alimentación por filtración y con frecuencia también para la locomoción; la mayoría de las especies tienen un cuerpo corto y caparazón bien desarrollado, que cubre completamente las extremidades de modo que no hay ninguna evidencia externa de la segmentación. Los organismos de estas familias tienen un caparazón reducido que sólo cubre la cámara de incubación. La cabeza sobresale en sentido anterior y lleva un par de antenas secundarias grandes y potentes, que el animal utiliza para remar hacia arriba a través del agua en una serie de sacudidas. La cabeza también lleva la primera antena (anténulas) y un ojo compuesto y un ocelo. En la figura 1 se representan las características principales de la familia Chydoridae, organismos que se encuentran dentro del grupo de los cladóceros (Korhola y Rautio, 2001).

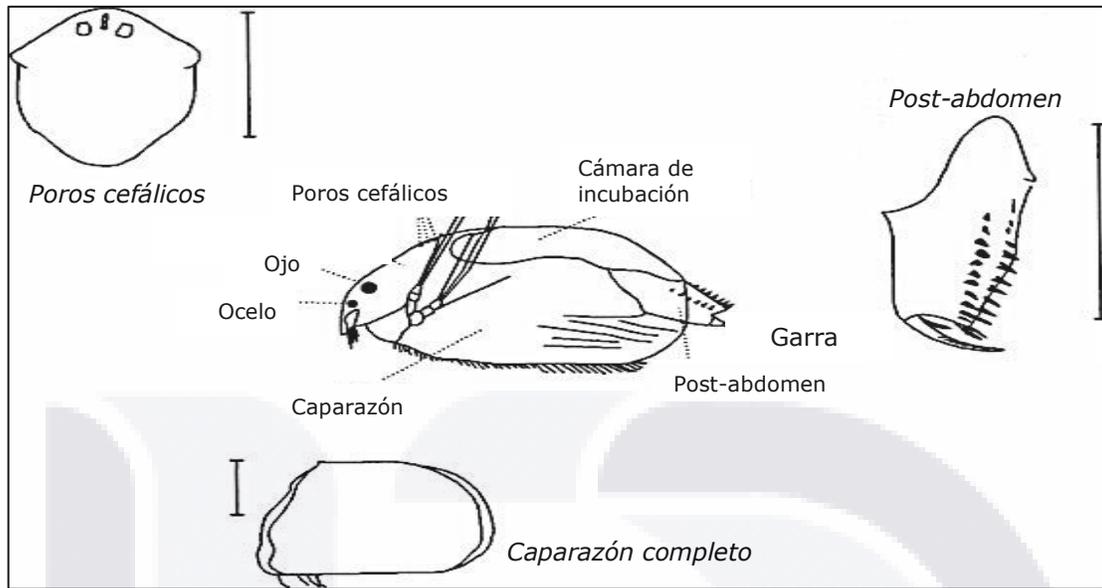


Figura 1. Características principales de la familia Chydoridae.

Imagen tomada de Korhola y Rautio: Cladocera and other branchiopod crustaceans (2001).

Daphnia magna es el cladóceros más comúnmente utilizado en ensayos ecotoxicológicos, por ser de fácil reproducción en laboratorio, y tener un ciclo de vida corto; éste organismo representa de manera ideal al zooplancton en estudios ecotoxicológicos (Núñez, 2005).

En México son muy pocos los estudios sobre cladóceros nativos, especialmente se carece de estudios sobre la fauna litoral que pertenece al orden Anomopoda (Elías-Gutierrez et al., 1997).

1.3.1 FAMILIA CHYDORIDAE

Los organismos de la familia Chydoridae habitan las regiones litorales de los cuerpos de agua y normalmente se asocian con las macrófitas o los sedimentos y se conocen como organismos “raspadores” de sustrato (Dos Santos-Silva, 2014).

Por lo general las regiones litorales representan una zona de interfase entre el sistema acuático y el sistema terrestre, estas zonas favorecen el desarrollo de diversas comunidades de zooplancton, entre los que puede

encontrarse a los organismos de la familia *Chydoridae* (Gómez-Díaz, 2008). Son contribuidores importantes de la producción secundaria y sirven como alimento para peces y macroinvertebrados; además, ya que los caparazones de los quidóridos se preservan en los sedimentos, éstos son comúnmente usados en estudios paleolimnológicos (Tremel et al., 2000).

De acuerdo a su morfología (diferencias en su cabeza, articulaciones, tórax y post abdomen), los quidóridos se pueden dividir en cuatro subfamilias: Euryercinae, Saycinae, Aloninae y Chydorinae (figura 2), todos los miembros de esta subfamilia son bentónicos o litorales y viven predominantemente relacionados a detritos de plantas y sedimentos orgánicos (Sacherová y Hebert, 2003).

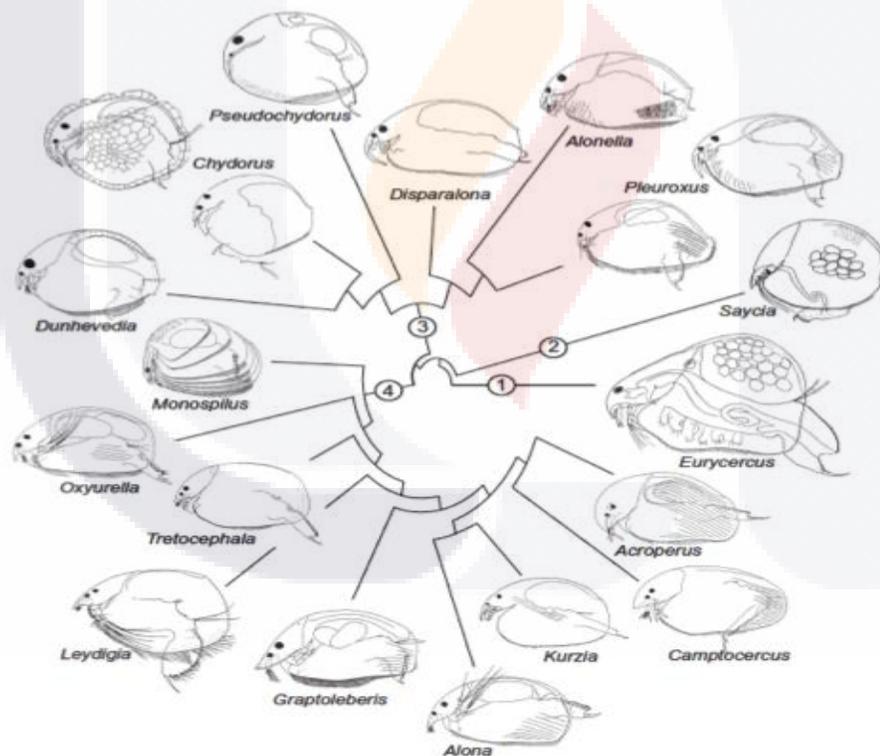


Figura 2. Morfología y filogenética de la familia Chydoridae
 Tomado de: Sacherová y Hebert, The evolutionary history of the Chydoridae (2003).

La familia Chydoridae tiene un cuerpo lateralmente comprimido, que representa una adaptación morfológica para entornos bentónicos. Otras familias como Daphnidae, Moinidae y Sididae tienen cuerpos redondos, pues son organismos adaptados para vivir en ambientes limnéticos. Esta característica morfológica tiene influencia en el número de huevos por camada

que los organismos incuban, un cuerpo aplanado tiene una cámara incubatoria pequeña, lo que reduce el número de huevos producidos (Kotov, 2006).

El cuerpo de los organismos dentro de la familia Chydoridae está cubierto de un par de valvas. La región cefálica está cubierta por un escudo cefálico, su forma y sus poros cefálicos permiten la identificación de especies. La parte anterior del escudo cefálico es un poco puntiagudo y produce una elongación (Frey, 1959). El cuerpo consiste de cabeza, tórax, y abdomen, la parte terminal está modificada hacia el post-abdomen y delimitada de la parte abdominal al lado dorsal por un par de setas natatorias y termina en un par de garras. El post-abdomen puede ser corto o elongado. Los apéndices del cuerpo incluyen un par de anténulas, antenas y 5 pares de miembros torácicos. El lóbulo distal interior de la extremidad sostiene 3 setas que pueden convertirse en ganchos que se utilizarían para raspar. La subfamilia Chydorinae tiene como característica 7 setas en el exopodito (lóbulo distal interior) de la extremidad torácica (Smirnov, 1996).

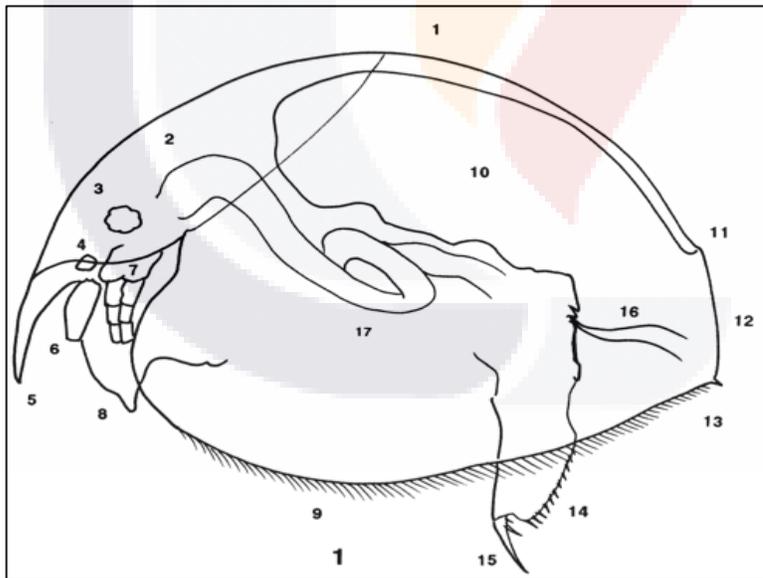


Figura 3. Estructura externa de *Pleuroxus trigonellus* (Chydoridae).

1 Margen Dorsal, 2 Escudo cefálico, 3 Ojo, 4 ocelo, 5 Rostro, 6 Antenula, 7 Antena, 8 Disco labral, 9 Margen ventral, 10 Cámara incubadora, 11 valva postero-dorsal, 12 valva postero-marginal, 13 Denticulos en la valva postero-ventral, 14 post-abdomen, 15 garra, 16 seta natatoria, 17 sistema digestivo. Imagen tomada de Cladocera: The Chydorinae and Sayciinae (Chydoridae) of the world.

Los organismos de la subfamilia *Aloninae*, poseen un cuerpo mas elongado, huevos más grandes y un mayor tiempo de desarrollo embrionario

en comparación con las especies pertenecientes a la subfamilia *Chydorinae*, que poseen características contrarias a las mencionadas (Santos-Wisniewski, 2006).

Debido a su tolerancia, los quidóridos se han usado como bioindicadores en análisis basados en la composición de la fauna total del sistema acuático (Hofmann et al., 2000).

1.3.1.1 GÉNERO *Alona*

Se han encontrado y descrito en diferentes estudios, alrededor de 8 especies de organismos similares al género *Alona*, incluyendo las especies *Alona aguascalientensis* y *Alona anamriae*, otras especies encontradas son *Alona glabra* Sars, 1901, *Alona* cf. *guttata* Sars, 1862 (figura 4), *Alona ossiani* Sinev, 1998, y *Alona setigera* Megard, 1967 (Sinev y Silva-Briano, 2012).

Son individuos filtradores, que se alimentan de microalgas, bacterias y materia orgánica y su reproducción es principalmente asexual por partenogénesis (Arnold, 1971). Muchos de los organismos de éste grupo se consideran organismos cosmopolitas (Sinev y Kotov, 2000).

Entre la información reportada para el género *Alona*, se sabe que su ciclo de vida varía según el alimento, o la temperatura, además de poder ser influenciado por otros factores fisicoquímicos del agua. El género tiene reportado un máximo de longevidad de 54 días, y se generan 2 huevos por camada, produciendo un total de 66 huevos a lo largo de su ciclo de vida (Dos Santos-Silva et al., 2014).

La especie *Alona iheringula* ha sido encontrada en Brazil, en diferentes regiones, donde la temperatura oscila entre los 20 y 25°C, y el pH es levemente ácido. Además, se encontró asociada a macrófitos, los neonatos tenían un tamaño de 288 µm, alcanzando madurez después de los 3.3 días y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con un tamaño promedio de 413 μm . El tamaño máximo fue de 510 μm alcanzado después de 11 días. Esta especie tuvo una longevidad máxima de 54 días y un tiempo de vida media de 46 días. La fecundidad promedio de las hembras partenogénicas fue de 2 huevos por camada, y un promedio de 47.6 huevos por hembra durante su ciclo de vida completo (Dos Santos-Silva et al., 2014).

A. iheringula es característica de la región litoral, donde se asocia a macrófitos, y consecuentemente, solamente se ha colectado cerca de éstos. La presencia de macrófitos produce una mayor diversidad a las especies pues proporciona refugio y es fuente de alimento para muchos organismos lo que produce una heterogeneidad en el ambiente (Kotov, 2006).

Alona rústica tiene una adaptación fisiológica de tolerancia a ambientes acidificados, y la ocurrencia de esta especie se da en sistemas ácidos, vive en temperaturas de 25 °C (Fryer, G., 1993).

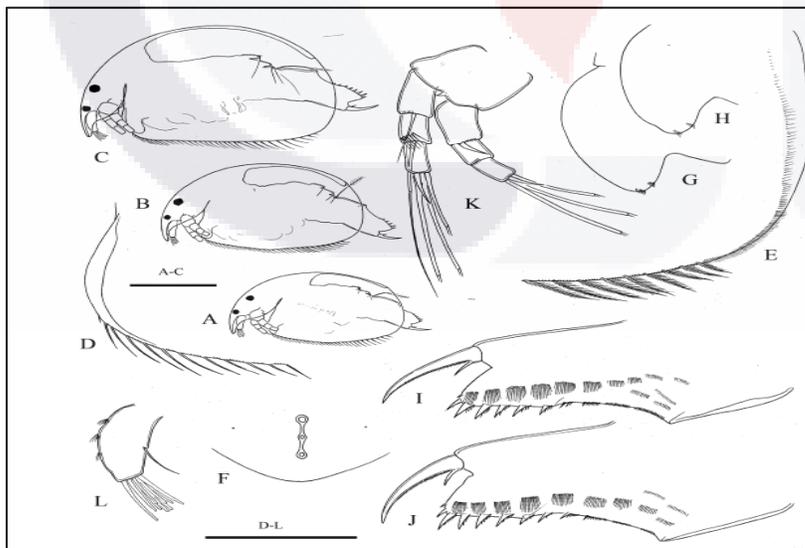
Se han registrado otras especies del género *Alona*, como *A. bromelicula* Smirnov, 1988, que es la única especie de este género que habita en agua acumulada de canales de hojas, en bosque tropicales (Sinev, 1988).

El grupo *guttata* es uno de los más pobremente estudiados del género *Alona*. Actualmente *Alona* cf. *guttata* ha sido reportada a nivel mundial, aunque inicialmente se describió en Noruega (Sinev, 2012). En México, el género *Alona* se ha encontrado en diferentes localidades del Estado de México y el Estado de Aguascalientes (Elías-Gutierrez, 1997).

Los estudios ecotoxicológicos en zooplancton de agua dulce son realizados más frecuentemente en organismos como rotíferos y cladóceros, debido a que ambos comparten similitudes en sus características reproductivas y metabólicas (Sarma, 2007).

1.3.1.1.1 *Alona cf. guttata*

Alona cf. guttata, posee una cabeza de tamaño moderado, un ojo más grande que el ocelo, posee tres poros cefálicos mayores, el poro de en medio es el más pequeño. (Fig. 4F). El tórax es 2 veces más grande que el abdomen. El post-abdomen (Fig. 4I-J), es corto, truncado con un ángulo distal prominente, y una longitud de 2.5 su estatura. El margen ventral es recto, la base en las garras está separada por el margen distal por una incisión clara. El margen distal es recto, con un ángulo de está el prominente. La región post anal del margen distal recto, es ligeramente cóncava. El ángulo preanal está bien definido y el ángulo postanal está ligeramente definido. Seis a ocho dentículo es marginales se desarrollan definida mente en este ángulo, y decrecen en tamaño basalmente. Cada dentículo tiene de tres a seis espínulas anteriores. La antena I (Fig 4L) es de tamaño moderado, con tres racimos de pequeñas y delgadas setulas en la cara anterior. La antena II (Fig. 4K) es relativamente corta, del segmento robusto salen ramificaciones de moderada altura y anchura, de los segmentos basales de estas ramificaciones salen segmentos de setas que no alcanzan el final del endopodito (Fig. 5J). Además tiene 6 pares de miembros torácicos (Fig. 5J).



A-B, hembras juveniles de instars I y II. C-L, hembra partenogenética. C, vista lateral. D-E, valvas antero-ventral y posteroventral. F, poros cefálicos. G-H, labrum. I-J, post-abdomen. K, antena. L, antena. Barras de escala muestran 0.1 mm para A-C, 0.05 para D-L.

Figura 4. *Alona cf. guttata* Sars, 1862, de Aguascalientes, México. Morfología externa. Modificado de Cladocerans of genus *Alona* Baird, 1843 (Cladocera: Anomopoda: Chydoridae) and related genera from Aguascalientes State, Mexico (Sinev y Silva-Briano, 2012)

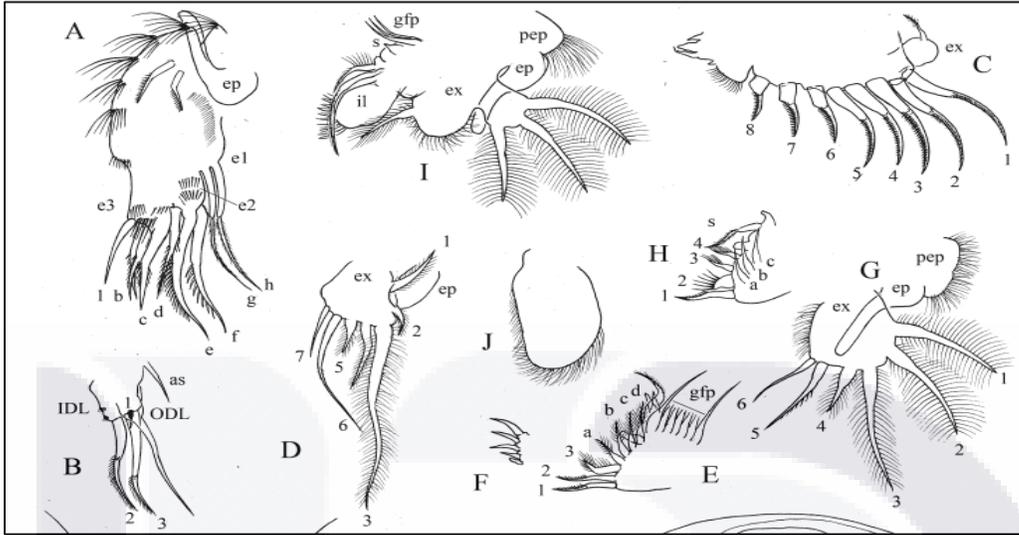


Figura 5 *Alona cf. guttata* Sars, 1862 de Aguascalientes, México. Detalles morfológicos.

Hembra partenogenética. A, miembro I. B, IDL y ODL del miembro I. C, miembro II. D, exopodite del miembro III. E–F, porción interna del miembro III. G, exopodite del miembro IV. H, porción interna del miembro IV. I, miembro V. J, miembro VI. K–M. Imagen tomada de Cladocerans of genus *Alona* Baird, 1843 (Cladocera: Anomopoda: Chydoridae) and related genera from Aguascalientes State, Mexico (Sinev y Silva-Briano, 2012)

1.4 TABLA DE VIDA

Un método para evaluar la salud de una población y calcular la expectativa de vida es la elaboración de una tabla de vida. Una tabla de vida muestra la probabilidad de supervivencia a una edad particular, la expectativa de un determinado organismo a diferentes edades, y la proporción de nacimientos en la cohorte. A partir de datos ordenados de supervivencia y fecundidad específicas por edades, es posible determinar algunos parámetros poblacionales como los que describen a continuación (Smith y Smith, 2007):

Tabla. 1 Parámetro demográficos y sus ecuaciones. Elaborado por Osorio-Treviño.

Parámetro	Ecuación
Supervivencia	$l_x = N_x/N_0$
Tiempo generacional	$T = \sum x l_x m_x / \sum l_x m_x$

Tasa neta de reproducción	$R_0 = \sum l_x m_x$
Fecundidad específica por edad	$m_x = \text{Número de hijos nacidos vivos de mujeres en un grupo de edad} / \text{Número de mujeres en el mismo grupo de edad}$
Expectativa de vida al nacer	$E_x = T_x / l_x$
Tasa intrínseca de crecimiento	$\sum e^{rt} l_x m_x = 1$

1.5 PRUEBAS DE TOXICIDAD

Para poder evaluar la toxicidad, se desarrollan pruebas agudas y crónicas estandarizadas, en este caso se enfatizará en aquellas pruebas que utilicen cladóceros. El efecto tóxico directo en los animales es cuantificado estadísticamente al determinar la CL₅₀ (Concentración letal media) (Hanazato, 2001).

El propósito de las pruebas de toxicidad es obtener información útil para lograr la protección de los organismos acuáticos de una especie determinada o, de todas las comunidades que integran la biota de un determinado ecosistema, frente a los peligros ocasionados por descargas de aguas residuales, domésticas o industriales, que pueden contener sustancias que alteren el equilibrio de los cuerpos receptores (Kopplin, 2004).

El cladóceros, *Ceriodaphnia dubia* es una de las muchas especies de dáfnidos comúnmente utilizados en pruebas biológicas para el establecimiento de criterios de calidad del agua (WQC). Este animal es especialmente adecuado para la evaluación de la toxicidad crónica debido a su facilidad de cultivo dentro del laboratorio y pruebas cortas de supervivencia (7d) (Mager, et al. 2011).

1.5.1 RESPUESTAS AGUDAS Y CRÓNICAS

Las respuestas agudas se originan de manera inmediata por acción o efecto de un tóxico en un organismo. En la evaluación de la toxicidad aguda, se determina la concentración letal media (CL_{50}) que es un parámetro importante en el análisis de la toxicidad. Por otro lado, las respuestas crónicas se pueden generar en diferentes niveles de los individuos expuestos a mediano o largo plazo (Jaramillo-Juárez et al., 2008).

Como resultado de exposiciones de tiempos largos a tóxicos, se desarrollan diversos efectos adversos (Rand, 1995). Estos efectos son más comúnmente subletales, que además, incluyen efectos en el crecimiento, reproducción y comportamiento (Newman, 2009). La duración de las exposiciones crónicas puede ser por un período del desarrollo, pueden ser vitalicias o extenderse por períodos de más de una generación. En exposiciones crónicas se miden otras respuestas diferentes que la muerte, ya que se trata de determinar la concentración del tóxico que se puede permitir en un cuerpo de agua (Kopplin, 2004).

1.6 TOXICIDAD DE METALES

El contenido de metales en aguas de desecho industrial o desechos urbanos depende de varios factores locales como el tipo de industria en la región y el estilo de vida que llevan los habitantes de esa región, además de la educación ambiental que posean sobre el impacto ambiental de aguas residuales (Klimek et al., 2013).

Es necesario conocer como afectan los metales a los organismos en contacto con ellos, y conocer las concentraciones aceptables de metales en aguas residuales para poder establecer criterios de calidad del agua. Las pruebas biológicas simples ofrecen una alternativa razonable para el análisis de la potencial toxicidad de las aguas residuales (Klimek et al., 2013). Factores

tales como la dureza del agua, pH y la temperatura afectan a la toxicidad de metales pesados para los invertebrados acuáticos, además de que se ha demostrado que dependiendo de la dureza y del catión responsable de la misma se puede modificar la toxicidad de los metales (Khengarot, 2001).

Los metales pesados llegan a ser tóxicos, por lo cual se encuentran en la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (SEMARNAT, 2009).

1.6.1. PLOMO

El plomo se encuentra en la naturaleza formando una gran variedad de minerales, principalmente la galena (sulfuro de plomo), constituye la fuente principal de producción comercial de este metal (Alvarado-Flores, 2010). Es un metal de color gris azulado, blando y maleable; se encuentra en el grupo 9 IVA de la tabla periódica, con número atómico 82, peso atómico 207.21, punto de ebullición de 1750°C a una atmósfera (Ubillo-Limus, 2003). Los compuestos más comunes de plomo son: el monóxido (PbO), el dióxido (PbO₂), el tetróxido (Pb₃O₄), el sesquióxido (Pb₂O₃), el carbonato, el sulfato, los cromatos, el arseniato, el cloruro, el silicato y la azida de plomo (Alvarado-Flores, 2010).

El plomo es capaz de acumularse en ecosistemas acuáticos, es un metal no esencial para los organismos y es considerado un contaminante de relevancia a nivel mundial ya que inclusive a bajas concentraciones es potencialmente tóxico; a pesar de que se ha disminuido su uso en procesos industriales, como en la elaboración de pinturas (WHO, 1995; Altinda et al., 2008).

Desde la década de 1990 al 2000, México ha estado en los primeros lugares de producción de plomo, que representa alrededor del 6% de la producción de plomo mundialmente. Los principales estados productores de

plomo en México son Zacatecas y Chihuahua, que producen aproximadamente el 70% de la producción total en el país (SEDESOL/INE, 1993, 1994).

En México, el valor máximo permisible para plomo en agua potable es de 0.010 mg/L (NOM-127-SSA1-1994). Sin embargo, no existen antecedentes para plomo encontrado sedimentos de ríos en México; sin embargo, en Estados Unidos y Canadá han sido reportadas concentraciones de 27-267 mg/Kg (ATSDR 1999) y de 35 mg/Kg (Environment Canada 1999) en dichos sedimentos.

Los ecosistemas acuáticos son receptores de muchos metales tóxicos, que se depositan en estos cuerpos de agua, debido a procesos naturales o a procesos antropogénicos; es por estos últimos procesos que las técnicas ecotoxicológicas se han vuelto tan necesarias al medir toxicidad de químicos contaminantes, en ecosistemas acuáticos (Brandao et al., 1992).

1.7 TOXICIDAD DE PESTICIDAS

La contaminación acuática por pesticidas es un tema de preocupación a nivel global (Toumi et al., 2014). Los pesticidas ejercen su impacto a diferentes niveles, como moléculas, organismos, individuos y comunidades; y estos efectos son notorios dependiendo la naturaleza del ecosistema donde se libera el pesticida (Hanazato, 2001). De entre los plaguicidas, los fungicidas son usados en la industria, en la agricultura, en el hogar y el jardín para protección de las semillas de granos durante su almacenamiento, para la eliminación de mohos que atacan las superficies pintadas; y para la protección de alfombras y telas en el hogar. El potencial que tienen los fungicidas para causar efectos adversos en los humanos puede variar (USEPA, 2015).

El uso continuo de pesticidas provoca cambios en el equilibrio pues afecta además a organismos que no son el objetivo principal de la sustancia

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tóxica. Estos pesticidas se pueden transferir a cuerpos de agua, por el escurrimiento provocado por lluvias, por lo que los ecosistemas acuáticos se ven de igual manera impactados por los pesticidas (Tidou et al., 1992; Aydin et al., 2005). El grupo de los piretroides son la clase de pesticidas más ampliamente usados (Toumia et al., 2014). En México, el 73% del territorio nacional es dedicado para la actividad agropecuaria. De éste, el 20% son tierras de cultivo los cuales cubren cerca de 30 millones de hectáreas. La agricultura es una actividad fundamental en el medio rural en el cual habita casi la cuarta parte de la población nacional, tiene un gran incidencia en el desarrollo ya que los productos agropecuarios están en la base de un gran número de actividades comerciales e industriales (FAO, 2016).

Los plaguicidas contienen moléculas que tienen como objetivo disminuir poblaciones de organismos y especies perjudiciales para la producción agropecuaria y forestal, además de evitar la propagación de enfermedades en humanos y animales (USEPA 2010). En México, su uso está destinado principalmente al control de enfermedades que afecta la producción agrícola, y en 2006, el consumo fue de 95,025 toneladas (SENER, 2007). Sin embargo, en México, son muy pocos los estudios realizados sobre uso y distribución geográfica de plaguicidas, y los estudios existentes se encuentran focalizados en plaguicidas organoclorados.

Los pesticidas pueden encontrarse en cuerpos de agua debido a procesos como escurrimiento, filtración y erosión de suelos donde han sido aplicados. El escurrimiento puede suceder durante lluvias o riego agrícola y movilizarse hasta cuerpos de agua superficiales y subterráneos, contaminando agua y sedimentos (Ongley 1996).

1.7.1 VINCLOZOLIN

Existen químicos liberados al ambiente debido a actividades antropogénicas, que han mostrado tener efecto sobre el sistema endócrino, causando disrupción endócrina en diversos organismos, tanto de fauna silvestre (incluyendo organismos planctónicos), como posiblemente en humanos (Haeba et al., 2008).

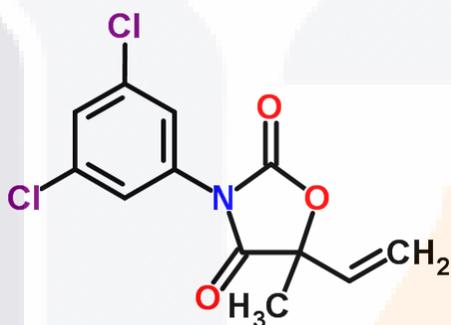


Figura 6. Vinclozolin. Estructura molecular. Tomado de The Merck Index Online.

El vinclozolin (3-(3,5-dichlorophenyl)-5-methyl-5-vinyl-oxazolidine 2,4-dione) (Spencer 1964) es un fungicida que actúa como antagonista de receptores androgénicos en vertebrados (Haeba et al., 2008) y pertenece al grupo de las dicarboximidas, tiene efectos sobre plagas fúngicas de frutas y vegetales, además de su uso en viñedos (USEPA 2003; Papadopoulou-Marukidou 1991). Debido a que se ha detectado en agua potable, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos ha redactado procedimientos para evaluar los dos principales metabolitos del vinclozolin, denominados M1 y M2, que se considera que se degradan completamente a 3,5-diclorofenil en agua (USEPA 2000).

Los químicos disruptivos endocrinos tienen efecto en los organismos crustáceos. Muchos de estos efectos son mediados por esteroides que regulan ciertos procesos y actúan vía intercelular por medio de receptores y factores de transcripción en una ruta muy parecida a la de vertebrados. En un estudio realizado por Haeba en 2008, se investigó los efectos de este químico junto con otros cuatro, ya que se sospechaba que interferían con la reproducción

normal en el cladócero *Daphnia magna*, este estudio documentó que de manera afirmativa, este químico tiene un efecto en la determinación de la reproducción del organismo (Haeba, 2008). La fecundidad, la tasa de crecimiento, maduración y la proporción de machos en una población, son algunos de los parámetros que llegan a ser afectados por las sustancias clasificadas como Disruptores Endócrinos (Dodson et al. 1999).

1.7.2 DELTAMETRINA

Recientemente se han desarrollado nuevos pesticidas sintéticos que pertenecen al grupo de los piretroides, tal es el caso de la cipermetrina y la deltametrina; éstos han sido más usado que los pesticidas del tipo órganoclorados (Mei-Fang et al., 2012).

La deltametrina es un piretroide sintético del tipo II (poseen un grupo alfa ciano en su molécula) con actividad insecticida y acaricida de amplio espectro. Actúa por contacto e ingestión afectando al sistema nervioso de los artrópodos y provocando su muerte. Se utiliza comúnmente para el control químico de *Triatoma infestans* (insecto hematófago) en varios países de América Latina, que transmite al parásito *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas. En general, la deltametrina es un triatomicida muy eficaz (Rojas de Arias A, et al., 2004). Es un piretroide sintético.

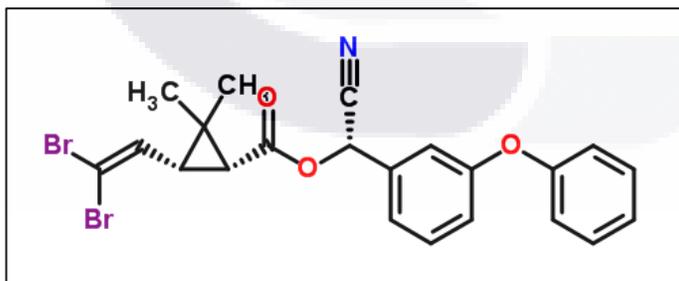


Figura 7 . Deltametrina. Estructura molecular. Tomado deThe Merck Index Online

El modo de acción de la deltametrina está relacionado a las uniones que forma en los canales de sodio, más específicamente a una secuencia de aminoácidos en este canal (Du et al., 2009). También se ha reportado para otros organismos, que ocurren efectos en la membrana del canal de cloro o en el complejo de Golgi, además de existir estudios en macro-invertebrados sobre

la generación de especies reactivas de oxígeno por efecto de la deltametrina (Toumi et al., 2014).

Se ha demostrado que los piretroides son poco tóxicos para las aves, y altamente tóxicos para peces y organismos acuáticos, pues estos últimos metabolizan y eliminan más lentamente a la sustancia tóxica (Yilmazetal, 2004).

Los efectos de los pesticidas en ecosistemas acuáticos son evaluados comúnmente con organismos como los cladóceros, entre los que destaca *Ceriodaphnia dubia*, que es sensible a un rango mayor de compuestos en comparación a otros invertebrados acuáticos (Von Der Ohe y Liess, 2004). Además, este organismo ha sido usado como un bioindicador para la presencia de químicos contaminantes, especialmente insecticidas (Bloomquist y Miller, 1986). Esta molécula ha sido detectada en aire, agua y sedimentos, además de en plantas y animales (Pawlisz et al., 1998).

1.8 BIOMARCADORES

Los biomarcadores se definen como respuestas sub-letales que modifican el comportamiento, la genética o biología del individuo expuesto. Se considera un buen biomarcador a aquel que tiene alta sensibilidad, que es de fácil medición, y que tiene relevancia ecológica (Arias-Almeida y Rico Martínez, 2011).

Son herramientas eficientes para identificar las perturbaciones en diversos parámetros ya sea fisiológicos o bioquímicos y generalmente se usan para evaluar los rangos tóxicos de los contaminantes del ambiente incluyendo pesticidas (Toumi, 2015).

Detectan propiedades estructurales o funcionales a diferentes tipos de

niveles organizacionales y revelan cambios de significancia ecológica que no se pueden detectar con otros análisis, en estos estudios los tóxicos son descargados intermitentemente (Olguín, H. F., 2004).

Los biomarcadores son utilizados para medir respuestas a factores de estrés (respuestas bioquímicas, fisiológicas e histológicas), los mejores biomarcadores son aquellos vinculados al metabolismo y contenido energético (Verslycke et al., 2004).

1.8.1 ASIGNACIÓN DE ENERGÍA

El metabolismo normal de un organismo, además de su crecimiento y reproducción, utiliza gran parte de la energía almacenada dentro de él. Esta energía, en forma de diferentes macromoléculas, como proteínas, carbohidratos y lípidos, puede ser modificada por diferentes factores externos, como lo son la exposición a tóxicos o alimento limitado; es por eso, que la asignación de energía dentro de un organismo funciona como un bioindicador de su estado de salud (Arzate-Cárdenas et al., 2012). Los recursos que se tengan disponibles para el crecimiento y reproducción son de gran importancia para la dinámica de toda la población, ya que de esto depende la supervivencia y estructura de la comunidad. Entendiendo como funciona este manejo de recursos podemos predecir las respuestas a nivel individual de algunos organismos acuáticos a los tóxicos (Bradley y Callow, 1991).

Existe una hipótesis que sugiere que el estrés inducido por un tóxico, conlleva cambios metabólicos, alterando la distribución de las reservas de energía del organismo, lo que afecta negativamente su crecimiento y reproducción (Verslycke et al., 2003).

2. ANTECEDENTES

2.1 ADAPTACIÓN DE ORGANISMOS

Se ha reportado que las condiciones de temperatura y fotoperiodos, tienen un efecto en la producción de huevos de 45 especies de cladóceros en relación al tiempo de eclosión, siendo que por lo general la mayoría de eclosiones se dan bajo la influencia de fotoperiodos largos (Nuñez y Hurtado, 2013).

La capacidad de los organismos acuáticos a adaptarse al estrés tiene consecuencias importantes para el estudio de los efectos biológicos de la contaminación del agua. Un número de investigadores ha tratado de evaluar el grado en que las especies acuáticas pueden adaptarse a los metales tóxicos y los niveles bajos de pH. En éste campo, Lloyd, en 1960 encontró que la exposición previa a las concentraciones de cinc subletales aumentó los tiempos de supervivencia de la trucha arco iris de juveniles en soluciones de zinc letales (Lloyd y Herbert, 1960).

2.2 TABLA DE VIDA

Para los organismos *L. leydigi* y *D. rostrata* que pertenecen a la familia Chydoridae, se han realizado estudios de tabla de vida, donde se ha demostrado que la duración de juveniles y mudas de adultos, no incrementa con la edad, mientras que para *Simocephalus acutirostratus*, *Scapholeberis kingi* y *Leydigia acanthocercoides* la duración del periodo entre los eventos de muda del exoesqueleto en los juveniles permanecen constantes con la edad. Esto tal vez debido a que los depredadores invertebrados son abundantes en la región litoral, y los pequeños cladóceros bentónicos pudieron haber respondido a este factor estresor al producirse en periodos cortos y madurar rápidamente,

de la misma manera que los organismos planctónicos pequeños (Robertson, 1988).

Debido a que *Daphnia magna* es un organismo planctónico, la relevancia ecológica se limita cuando se prueba en agua que deriva de sedimentos, por lo tanto es deseable que se utilicen organismos que posean las mismas ventajas de *Daphnia*, pero que habite en los sedimentos (Dekker et al., 2002).

Un tóxico puede actuar en los procesos fisiológicos y bioquímicos y por lo tanto afectar los parámetros demográficos, por ejemplo el crecimiento poblacional es estimado por la tasa intrínseca de crecimiento (r), es esencial para la persistencia o extinción de la población y directamente relacionada a los datos de tabla de vida de cada individuo de una población. Los ecologistas han usado la tabla de vida para evaluar supervivencia, fecundidad y tasa de crecimiento de la población bajo diferentes condiciones ambientales (Klitittgen et al., 1996).

2.3 DELTAMETRINA

En un estudio realizado por Toumi et al. (2013), se indicó que la deltametrina actúa en la reproducción de dáfidos al disminuir el número de neonatos y el crecimiento, esto debido al aumento de anomalías y a la producción de machos como respuesta al tóxico (Toumi et al., 2013).

Los pesticidas de tipo piretroide, han sido probados como tóxicos para organismos de ambientes acuáticos, se probó que el efecto del lindano y deltametrina en el mesocosmos fue letal para los microorganismos filtradores. Un efecto indirecto de la deltametrina fue el florecimiento del fitoplancton (Abiba et al., 1992).

No hay estudios reportados para este tóxico en especies de la familia Chydoridae; no obstante, existen estudios en cladóceros, como el estudio realizado por Leboulanger et al. (2008) utilizando a *Moina micrura*, y el estudio realizado por Lopes et al. (2007) con *Diaphanosoma brachyurum*.

2.4 PLOMO

De acuerdo a los resultados obtenidos en estudio realizado por De Schampelaere y Janssen (2002), utilizando a *Daphnia magna* como organismo de prueba, indicaron que la mayoría del calcio ingerido es por el agua, y que el plomo (u otros metales suspendidos que compiten con el calcio) son absorbidos por la vía del calcio, por lo tanto se esperaba que la toxicidad disminuyera en un medio con abundancia de calcio, sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que la toxicidad del plomo en dáfnidos es independiente a la concentración de calcio del medio.

2.5 REASIGNACIÓN DE ENERGÍA

Un indicador que refleja el estado funcional de los organismos acuáticos es la medición de reservas y almacenamiento de energía dentro del organismo. Se modifica en respuesta a condiciones ambientales, ya que si se modifica su entorno, son notables estos cambios en el organismo (Arzate-Cárdenas et al. 2012).

En el cladóceros *Daphnia magna*, se ha observado que el efecto de la inanición produce cambios en la fecundidad, en relación al número de huevos que se producen por camada, disminuyendo la tasa de fecundidad cuando la cantidad de alimento está limitada (Bradley et al. 1991).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente en el mundo se producen una gran cantidad de compuestos químicos, siendo muchos de estos productos peligrosos y nocivos para la salud, por lo que es necesario evaluar los riesgos que directa o indirectamente se generan por su uso.

La descarga de compuestos peligrosos al ambiente puede causar consecuencias serias, pues en muchos casos en la naturaleza no existen procesos físicos o biológicos que permitan su degradación a formas inocuas.

Se deben seguir métodos convencionales para el control y monitoreo de aguas naturales y efluentes, y además, se deben realizar evaluaciones de riesgo en las cuales los resultados de pruebas de toxicidad son un elemento para la definición del riesgo o daño potencial para la salud.

En el estado de Aguascalientes se ha reportado la presencia de diversos cladóceros nativos, en diferentes cuerpos de agua, entre ellos, se ha identificado la presencia de la especie *Alona* cf. *guttata*. Este organismo es importante porque al ser consumidor primario y miembro del zooplancton es un eslabón esencial en las redes tróficas de los ecosistemas dulceacuícolas. A pesar de que existen datos para otras especies de cladóceros, para la especie *Alona* cf. *guttata* no existe información sobre su ciclo reproductivo o tiempo de vida. Por lo anterior se llevará a cabo el análisis de tabla de vida modificando factores como tipo y cantidad de alimento, y temperatura, para conocer las condiciones ideales de crecimiento y reproducción de esta especie.

No obstante, se ha reportado que la duración de los ciclos de vida de las especies de quidóridos oscila entre 15 y 94 días, y según lo reportado para algunas especies de *Alona* su ciclo de vida aproximado es de entre 15 y 54 días. Comparando estos datos con los reportados para *Daphnia magna*, que son de 40 a 56 días (dependiendo la temperatura), nos es de interés conocer el ciclo de vida de *Alona* cf. *guttata* para poder hacer una comparación con *D.*

magna que es actualmente el organismo de prueba más utilizado del orden cladóceros.

Teniendo en cuenta el marco de referencia y la necesidad de la evaluación de la presencia de sustancias tóxicas en agua, en este proyecto se estudiará a este cladóceros, con el fin de utilizarlo como modelo experimental para ensayos de toxicología ambiental.

4. HIPÓTESIS

Si el cladóceros litoral *Alona cf. guttata* puede propagarse en condiciones de laboratorio bajo diferentes condiciones (temperatura, cantidad y calidad de alimento), entonces podrán realizarse estudios demográficos (tabla de vida) que permitan conocer su ciclo de vida, y por consiguiente se encontrarán las condiciones óptimas para la producción de organismos para pruebas toxicológicas. Por otra parte, si este cladóceros es sensible a tóxicos el plomo, la deltametrina, o el vinclozolin, ésta podrá emplearse como un organismo modelo para las pruebas de toxicidad.

5. OBJETIVO GENERAL

Se establecerán las condiciones óptimas para el cultivo y reproducción de *Alona cf. guttata* en condiciones de laboratorio con el fin de obtener organismos suficientes para implementar pruebas de toxicología acuática, y de acuerdo a su sensibilidad, poder proponerlo como organismo modelo para toxicología acuática.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Se desarrollará un protocolo para estudiar el efecto de la temperatura y alimento en el desarrollo y reproducción del cladóceros *Alona cf. guttata*.
2. Se implementarán pruebas de toxicidad aguda en *Alona cf. guttata* de acuerdo al protocolo de toxicidad aguda ISO 6341:2012 para *Daphnia magna* Straus y se comparará su sensibilidad a Plomo, Deltametrina y Vinclozolin que son tóxicos de interés ambiental.
3. Se llevarán a cabo pruebas de toxicidad subletal con los cuales posteriormente se hará el análisis con biomarcadores de efecto principalmente sobre la reasignación energética en el cladóceros *Alona cf. guttata*.

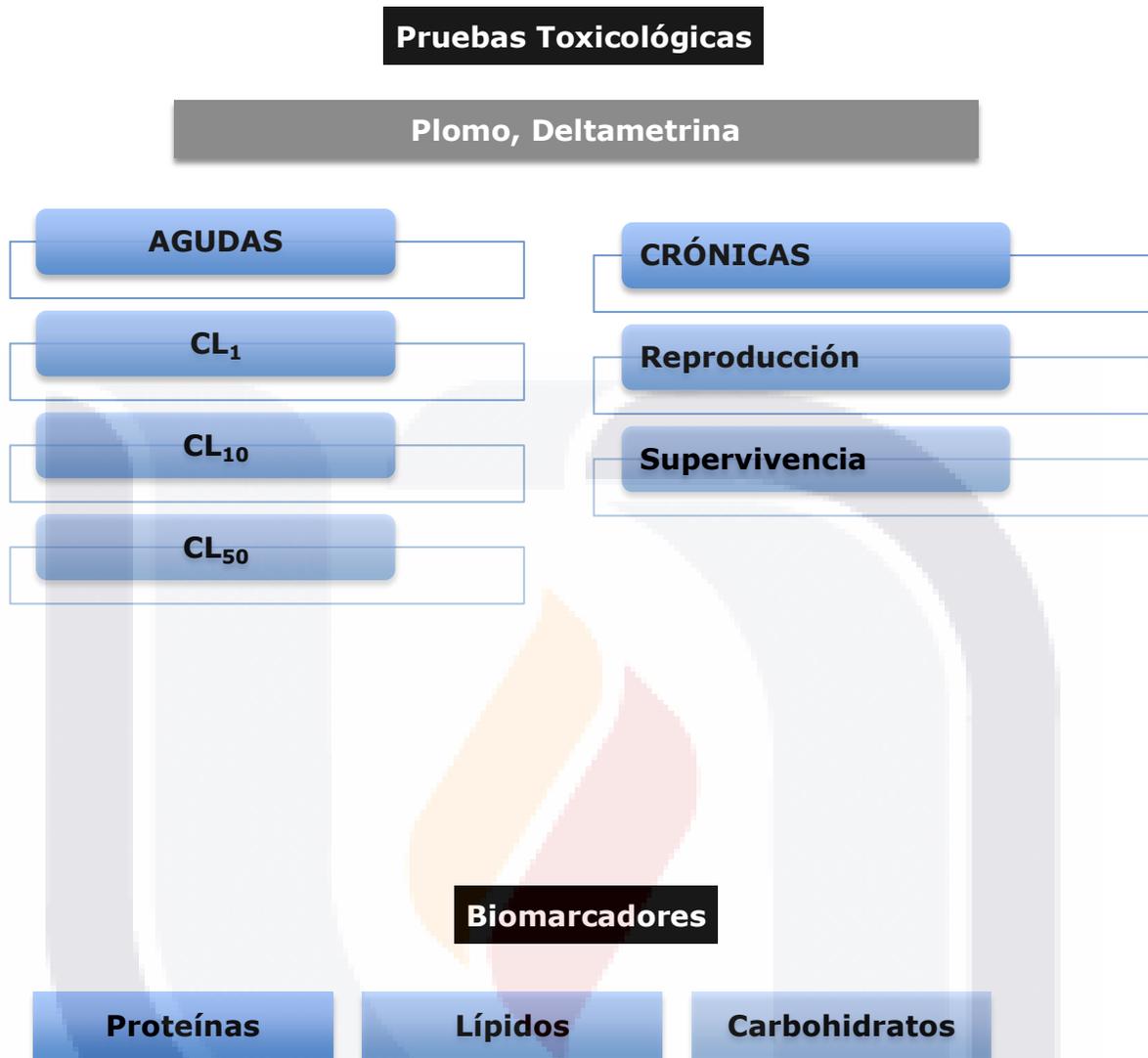
7. METAS

- Selección del tipo de alimento que se utilizará para generar la tabla de vida.
- Establecer un rango de concentración de alimento adecuado para el crecimiento del organismo.
- Análisis de Tabla de Vida, con 4 factores diferentes a analizar: Tipo de Alimento, Concentración de alimento, temperatura (20°C y 25°C) y tipo de sustrato (artificial y suelo de jardín)
- Establecer un rango de concentraciones de los tóxicos para las pruebas agudas.
- Determinación de la concentración letal 50 para los tóxicos y plomo, deltametrina y vinclozolin.
- Determinación de la concentración letal 10 para los tóxicos plomo, deltametrina y vinclozolin.
- Determinación de la concentración letal 1 para los tóxicos plomo, deltametrina y vinclozolin.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Determinación del efecto del tóxico en la reasignación energética del organismo mediante el análisis de proteínas, lípidos, carbohidratos y contenido calórico.
 - Determinación de la concentración efectiva media.

8. MATERIALES Y MÉTODOS





8.1 MANTENIMIENTO DE LA CEPA

La cepa de *Alona cf. guttata* se ha mantenido en cultivo continuo en el Laboratorio de Toxicología Ambiental del Edificio 60 de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, garantizando su reproducción a través de hembras partenogénicas. El medio de cultivo consta de agua dura reconstituida (USEPA, 2002), mostrado en el anexo 1, suplementado con la microalga *Nanochloropsis oculata* (10^6 células mL^{-1}).

Además, algunos de los cultivos cuentan con un sustrato artificial que consta de arena de sílice (70 %), caolín (25 %) y materia orgánica (abono de borrego, 5 %) (Gómez-Díaz, 2008), o con suelo de jardín. Se mantienen a 20 y 25 ± 2 °C dentro de una cámara bioclimática con fotoperiodo de 12 horas luz por 12 horas de oscuridad (12:12 h)

8.2 CULTIVO DE MICROALGAS

Se realizan cultivos monoespecíficos empleando el medio basal de Bold. El cultivo de las microalgas se realizó en condiciones asépticas a temperatura constante de 25 ± 1 ° C, e iluminación continua con lámparas fluorescentes "luz de día" (aproximadamente 5000 luxes).

Después del tiempo adecuado de crecimiento, los cultivos se mantuvieron en refrigeración por dos días para permitir la sedimentación y concentración de las células; posteriormente, se desechó el sobrenadante y se prosiguió al conteo celular en cámara de Neubauer. Las microalgas se conservaron en refrigeración a 4 °C durante dos semanas; después de este tiempo fueron desechadas para su renovación.

8.3 TABLA DE VIDA

La metodología utilizada se modificará con base en el protocolo propuesto por Gómez-Díaz (2008). Se utilizan vasos de precipitados de 100 mL, en los cuales se coloca la cantidad correspondiente al sustrato artificial o suelo de jardín (0.033 g). Se adicionan 60 mL de agua dura reconstituida y algunas de las microalgas *Nanochloropsis occulata*, *Chlorella vulgaris* y *Pseudokirchneriella subcapitata*, a diferentes concentraciones.

Se realizaron 6 réplicas para cada uno de los tratamientos a dos temperaturas (20 y 25 °C). Se realizó el conteo diario de los neonatos en cada una de las réplicas y el número de muertos. El cambio de medio se realizó cada 7 días.

8.4 PRUEBAS DE TOXICIDAD

Para las pruebas de toxicidad se emplearon los siguientes tóxicos:

- Plomo (reactivo analítico): Nitrato de Plomo (Estándar para Absorción Atómica), del Fluka Analytical, Lote: BCBL79IIV. De 1,000 mg/L.
- Deltametrina (Reactivo analítico): Deltametrina (Pestanal), de Fluka Analytical, Lote: 5ZBC059XV. De 250 mg.
- Vinclozolin (reactivo analítico): Vinclozolin (Estándar analítico para HPLC), de Riedel- de Haën, Lote: 2296X.

8.4.1. TOXICIDAD AGUDA

Procedimiento modificado con base en el protocolo ISO 6341 de toxicidad aguda para *Daphnia magna* Straus. El propósito fue determinar la concentración media efectiva de inmovilización (EC50) de una sustancia en *Alona cf. guttata*. La toxicidad aguda fue expresada como CL50.

El organismo se expuso a la sustancia de prueba añadida al agua a un rango de concentraciones por 48 h. Se lleva un control sin tóxico. El número de animales debe ser de al menos 20 para cada concentración de tóxico probada, divididos en 4 lotes con 5 animales cada uno. Colocados en al menos 2 mL de solución para cada animal. La solución de prueba se prepara justo antes de introducir al organismo. La temperatura se mantuvo a 20 y 25 °C \pm 1°C.

Las soluciones de prueba no se someten a aireación. Y se mantiene a los organismos sin alimento. Se inspeccionan los organismos a las 24 h de exposición y después a las 48 h. La prueba se lleva a cabo seleccionando organismos aclimatados a 20 y 25°C para desarrollar las pruebas agudas exponiéndolos a cada grupo de animales a temperaturas de 20 y 25°C durante las pruebas de toxicidad (OECD, 1984).

En la prueba de inmovilización aguda, un rango de concentraciones de la sustancia investigada, ejerce diferentes efectos tóxicos en la capacidad de natación del organismo, bajo condiciones idénticas de prueba. En el control, no más del 10% de los organismos debe quedar inmovilizado o atrapado en la superficie del agua. Se utiliza agua reconstituida, para que sea similar a la de cultivo. El organismo no debe ser mayor a 24 h de nacido en el principio de la prueba. Se utilizan 5 organismos por grupo son utilizados para cada concentración, (4 grupos de 5 organismos por concentración). Incluyendo el control. El organismo de prueba no se alimenta durante la prueba, en 2 ml de solución por grupo. A una temperatura de prueba de 20 °C.

Las concentraciones usadas son en series, donde la mayor concentración de prueba debe resultar preferentemente en el 100% de inmovilización. Y la concentración menor no debe mostrar efectos observables. El porcentaje de inmovilidad a 24 horas es determinado contra la concentración.

8.4.2. TOXICIDAD CRÓNICA

Procedimiento modificado con base en el protocolo de la EPA 1002.0 para toxicidad crónica (2002), para dáfnidos. Se utilizaron neonatos de menos de 24 h de edad y se exponen a diferentes concentraciones de prueba por 21 días para determinar supervivencia y fecundidad diarias.

Se utilizaron placas de 24 pozos, se realizaron 4 replicas con 5

organismo cada pozo. A una temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en ciclos de luz:oscuridad de 16h:8h.

Se registraron parámetros demográficos, tipo tabla de vida.

8.5 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES: REASIGNACIÓN DE ENERGÍA

8.5.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE PROTEÍNAS

La metodología utilizada se modificará en base al protocolo propuesto por Arzate-Cárdenas y Martínez-Jerónimo en 2012.

Para determinar el contenido total de proteína se llevó a cabo el método de Bradford (1976) usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Se utiliza un total de 960 organismos homogeneizados de 7 días de edad (40 organismos por cada concentración, en 4 réplicas). Para cada muestra se añaden 300mL de reactivo de Bradford, incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Se lee la absorbancia a 595 nm y los resultados se expresan como μg proteínas/organismo.

Se analizaron las muestras a las concentraciones 1/5, 1/10, 1/20, 1/40 y 1/80 de la concentración letal para plomo, y para deltametrina. Además de analizarse los controles negativos y las curvas de calibración correspondientes.

8.5.2. DETERMINACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO TOTALES

El método de fenol-ácido sulfúrico (Minami et al., 2005), se basa en la formación de un complejo de color amarillo-naranja como resultado de la reacción de hidratos de carbono con fenol en un medio fuertemente ácido, se utiliza para cuantificar los hidratos de carbono totales. Se utilizó el homogenado de 960 organismos de 7 días de edad (40 organismos por cada concentración, en 4 réplicas), y se añade ácido sulfúrico concentrado y fenol saturado. Se lee la absorbancia 492 nm y los resultados se expresan como μg carbohidratos /organismo.

Se analizaron las muestras a las concentraciones 1/5, 1/10, 1/20, 1/40 y 1/80 de la concentración letal para plomo, y para deltametrina. Además de analizarse los controles negativos y las curvas de calibración correspondientes.

8.5.3. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES

El método sulfofosfovanillina (Frings y Dunn, 1970) se utiliza para determinar los lípidos totales, utilizando colesterol como un estándar. El extracto lipídico se hace reaccionar con reactivo de vainillina (9.2 mM) y la absorbancia del complejo de color se lee a 530 nm. Los resultados se expresan como μg lípidos/ organismo.

Se analizaron las muestras a las concentraciones 1/5, 1/10, 1/20, 1/40 y 1/80 de la concentración letal para plomo, y para deltametrina. Además de analizarse los controles negativos y las curvas de calibración correspondientes.

8.5.4. CONTENIDO CALÓRICO

Los hidratos de carbono, lípidos y proteínas se utilizan para calcular el contenido calórico de especímenes expuestos al tóxico. El contenido calórico se estima multiplicando el contenido de cada macromolécula por su factor específico: 4.10 cal/mg para los carbohidratos, 5.65 cal/mg para la proteína y 9,45 cal/mg de lípidos. Los resultados se expresaron como μ cal/ organismo (Arzate-Cárdenas y Martínez-Jerónimo, 2012).

8.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De los tratamientos se determina la longevidad (días), neonatos promedio por reproducción, edad de la primera reproducción (días). Así como también, la información de las tablas de vida.

El análisis estadístico de los ensayos con las concentraciones de alimento, y la temperatura al mismo tiempo se aplica ANOVA multiactorial, cuando se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos se aplica una prueba de comparación múltiple de LSD, mediante el programa estadístico R Studio.

9. RESULTADOS

9.1 TABLA DE VIDA

9.1.1 PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS

Se obtuvieron valores para los parámetros de tabla de vida: tiempo de vida media, tiempo generacional, fecundidad específica por edad, tasa neta de reproducción y tasa de crecimiento poblacional. Se establecieron como

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

factores: el tipo de sustrato, la temperatura de cultivo, el tipo y concentración de alimento. En las Tablas siguientes se muestran las respuestas poblacionales para cada tratamiento de factores utilizado, con referencia al tipo de alimento usado. En la Tabla 2, utilizando *Pseudokirchneriella subcapitata*, se observa que a concentraciones altas la supervivencia de *Alona* cf. *guttata* se ve comprometida, siendo que para concentraciones bajas con esta microalga, el organismo tiene una tendencia más alta a sobrevivir, e incluso se registra reproducción.

En la Tabla 3, se muestran los parámetros demográficos obtenidos durante el cultivo con *Saccharomyces cerevisiae*, donde se obtuvo que independientemente del tipo de sustrato, la supervivencia máxima de *Alona* cf. *guttata* oscila entre los 2 y 4 días, siendo que a temperatura de 25 °C existe una mayor supervivencia.

En la Tabla 4 se observan los parámetros demográficos obtenidos durante el cultivo con la microalga *Nannochloropsis oculata*, en la tabla se observa que las condiciones más favorables de cultivo se encuentran a concentraciones de entre 1 y 2 millones de células/mL, a una temperatura de 25 °C y en presencia de suelo de jardín como sustrato. Mientras que a concentraciones más altas y más bajas del alimento, se observa una disminución en la supervivencia y en las tasas de reproducción.

Al utilizar *Chlorella vulgaris* como alimento, como se muestra en la Tabla 5, se obtiene que las condiciones más favorables de cultivo se encuentran a concentraciones de alimento de entre 1 y 2 millones de células/mL, a una temperatura de 25 °C y en presencia de suelo de jardín como sustrato. De manera similar a lo obtenido con la microalga *Nannochloropsis oculata*. Mientras que a concentraciones más altas y más bajas del alimento, se observa una disminución en la supervivencia y en las tasas de reproducción.

Tabla 2. Parámetros demográficos de *Alona cf. guttata* cultivado con *Pseudokirchneriella subcapitata* como alimento. n=24

Sustrato	Temperatura (°C)	Concentración de alimento (cél/ml ⁻¹)	TVM (días)	G (días)	mx	R ₀	E ₀	r
Artificial	20	250,000	16.0	10.9	2.5	2.1	11.0	0.002
		500,000	16.3	11.0	2.6	2.1	12.4	0.002
		1,000,000	12.2	10.4	2.4	1.3	10.9	0.002
		1,500,000	9.5	8.5	1.4	0.8	8.7	0.002
		2,000,000	2.0	0.0	0.0	0.0	1.6	0.006
		4,000,000	2.6	0.0	0.0	0.0	2.2	0.151
	25	250,000	10.8	8.44	1.6	1.1	10.3	0.002
		500,000	11.3	9.5	2.4	1.6	10.8	0.002
		1,000,000	12.7	10.8	2.5	1.4	12.2	0.002
		1,500,000	11.9	10.1	2.1	1.2	11.4	0.002
Suelo de Jardín	20	250,000	11.5	10.1	2.7	1.5	11.0	0.002
		500,000	12.9	10.9	3.3	1.8	12.4	0.002
		1,000,000	11.4	10.0	2.2	1.2	10.9	0.002
		1,500,000	9.2	8.5	1.5	0.8	8.7	0.002
	25	250,000	14.2	10.2	2.4	1.8	13.7	0.002
		500,000	15.6	10.1	1.9	1.8	15.1	0.002
		1,000,000	11.7	9.0	1.8	1.2	1.8	0.002
		1,500,000	9.4	8.5	1.4	0.8	8.9	0.002

Tiempo de vida media=TVM. Fecundidad específica por edad = mx. Expectativa de vida al nacer=-E0. Tasa neta de reproducción= R0. Tiempo generacional= G. Tasa de crecimiento poblacional= r.

Tabla 3. Parámetros demográficos de *Alona cf. guttata* cultivado con *Saccharomyces cerevisiae* como alimento. n=24

Sustrato	Temperatura (°C)	Concentración de alimento (mg/L)	TVM (días)	G (días)	mx	R ₀	E ₀	r
Artificial	20	0.015	2.1	0	0	0	2.0	0.14
		0.03	2.5	0	0	0	2.2	0.14
		0.06	3.0	0	0	0	3.1	0.16
		0.075	2.3	0	0	0	2.2	0.15
Artificial	25	0.03	2.1	0	0	0	2.3	0.14
		0.06	3.3	0	0	0	3.4	0.15
		0.12	3.8	0	0	0	3.9	0.14
		0.15	3.5	0	0	0	3.7	0.16
Sin Sustrato	20	0.015	3.2	0	0	0	3.3	0.19
		0.03	2.3	0	0	0	2.2	0.17
		0.06	3.9	0	0	0	1.6	0.14
		0.075	2.9	0	0	0	2.2	0.19
Sin sustrato	25	0.06	4.0	0	0	0	3.7	0.14
		0.03	3.2	0	0	0	3.5	0.20
		0.12	3.4	0	0	0	3.5	0.16
		0.15	2.8	0	0	0	2.3	0.19

Tiempo de vida media=TVM. Fecundidad específica por edad = mx. Expectativa de vida al nacer=-E0. Tasa neta de reproducción= R0. Tiempo generacional= G. Tasa de crecimiento poblacional= r.

Tabla 4. Parámetros demográficos de *Alona cf. guttata* cultivado con *Nannochloropsis occulata* como alimento. n=24

Sustrato	Temperatura (°C)	Concentración de alimento (cél/ml ⁻¹)	TVM (días)	G (días)	mx	R ₀	E ₀	r
Artificial	20	250,000	31.0	19.0	14.5	11.2	30.5	0.002
		500,000	26.9	17.9	14.0	9.8	26.4	0.002
		1,000,000	29.7	19.8	14.5	10.2	29.2	0.002
		1,500,000	35.2	22.8	16.5	12.3	34.6	0.002
		2,000,000	53.0	27.2	30.9	28.9	52.5	0.002
		4,000,000	49.2	25.4	29.7	25.8	48.4	0.002
		8,000,000	34.7	19.6	23.1	18.8	34.2	0.002
	25	250,000	36.5	23.3	19.4	13.9	35.9	0.002
		500,000	32.4	20.6	18.9	13.9	31.9	0.002
		1,000,000	34.5	22.3	16.7	12.3	16.7	0.002
		1,500,000	36.6	22.6	19.7	14.7	33.7	0.002
		2,000,000	47.4	23.7	26.7	23.6	47.3	0.002
		4,000,000	39.8	20.1	25.0	21.9	39.3	0.002
		8,000,000	33.5	19.1	21.6	18.3	21.6	0.002
Suelo de Jardín	20	250,000	32.6	20.8	15.9	11.7	32.0	0.002
		500,000	28.6	19.4	17.2	12.0	28.0	0.002
		1,000,000	34.2	21.9	16.4	12.1	33.6	0.002
		1,500,000	35.6	34.9	19.6	13.4	34.9	0.002
		2,000,000	51.4	25.0	31.7	29.2	50.8	0.002
		4,000,000	51.0	25.5	30.3	27.5	50.5	0.002
		8,000,000	37.4	21.4	24.4	20.6	36.7	0.002
	25	250,000	35.0	22.1	17.9	13.0	34.4	0.002
		500,000	32.8	20.9	20.4	14.6	32.3	0.002
		1,000,000	36.4	22.9	18.8	13.7	35.8	0.002
		1,500,000	38.4	23.5	20.9	15.4	37.8	0.002
		2,000,000	49.6	24.5	28.5	25.5	49.0	0.002
		4,000,000	49.7	25.6	26.3	22.9	49.2	0.002
		8,000,000	39.5	20.4	20.6	18.0	39.0	0.002

Tiempo de vida media=TVM. Fecundidad específica por edad = mx. Expectativa de vida al nacer=-E0. Tasa neta de reproducción= R0. Tiempo generacional= G. Tasa de crecimiento poblacional= r.

Tabla 5. Parámetros demográficos de *Alona cf. guttata* cultivado con *Chlorella vulgaris* como alimento. n=24

Sustrato	Temperatura (°C)	Concentración de alimento (cél/ml ⁻¹)	TVM (días)	G (días)	mx	R ₀	E ₀	r
Artificial	20	250,000	32.4	20.1	17.1	13.8	31.9	0.002
		500,000	27.9	17.8	15.3	11.8	27.4	0.002
		1,000,000	28.9	18.1	18.2	14.4	28.4	0.002
		1,500,000	33.3	20.1	19.7	16.3	32.8	0.002
		2,000,000	36.5	21.4	20.4	15.8	35.8	0.002
		4,000,000	34.7	20.4	18.8	15.0	34.1	0.002
		8,000,000	29.8	19.1	17.4	12.6	29.3	0.002
	25	250,000	34.4	22.3	22.3	16.3	33.8	0.002
		500,000	32.1	20.0	18.6	14.1	31.2	0.002
		1,000,000	37.5	22.2	15.7	13.2	37.0	0.002

Suelo de Jardín		1,500,000	36.5	22.5	24.9	18.8	35.0	0.002	
		2,000,000	35.9	21.7	18.9	15.1	35.3	0.002	
		4,000,000	37.6	22.8	25.9	20.5	37.1	0.002	
		8,000,000	30.2	19.6	19.6	14.5	29.7	0.002	
	20		250,000	31.5	20.1	17.5	13.5	31.0	0.002
			500,000	32.1	20.0	18.3	14.6	31.6	0.002
			1,000,000	38.0	21.6	19.6	17.3	37.5	0.002
			1,500,000	35.6	23.7	19.5	13.4	34.9	0.002
			2,000,000	40.3	23.1	21.2	16.6	39.5	0.002
			4,000,000	35.9	21.0	17.8	14.2	35.3	0.002
			8,000,000	32.1	19.5	15.6	12.2	31.6	0.002
			25		250,000	35.1	22.1	20.6	15.1
	500,000	31.7			19.6	19.2	14.6	27.4	0.002
	1,000,000	37.9			22.5	21.9	17.2	28.4	0.002
	1,500,000	38.2			22.7	25.2	19.9	32.8	0.002
	2,000,000	46.6			24.1	24.6	22.1	35.8	0.002
4,000,000	44.8	24.4			23	20.2	34.1	0.002	
8,000,000	39.1	21.2			17.6	15.6	29.3	0.002	

Tiempo de vida media=TVM. Fecundidad específica por edad = mx. Expectativa de vida al nacer=-E0. Tasa neta de reproducción= R0. Tiempo generacional= G. Tasa de crecimiento poblacional= r.

Se realizó una prueba de ANOVA para comparar los diferentes tratamientos de cultivo y se determinó cual sería el óptimo para el cultivo de *Alona* cf. *guttata*. El ANOVA junto con la prueba LSD-Fisher, dieron como resultado que los mejores tratamientos a utilizarse para el cultivo de *Alona* cf. *guttata* son:

Utilizando *Nannochloropsis oculata* a una concentración de 2,000,000 células/ml, a temperatura de 20 °C o 25 °C, en suelo de jardín o sustrato artificial. Valor t= 1.96, alfa= 0.05).

En la figura 8, se muestran los datos de supervivencia de *Alona* cf. *guttata* utilizando *Nannochloropsis oculata* como alimento. Se observa como las supervivencias más altas son con el uso del alimento a concentraciones entre 2 y 4 millones de células/ml.

9.1.2 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

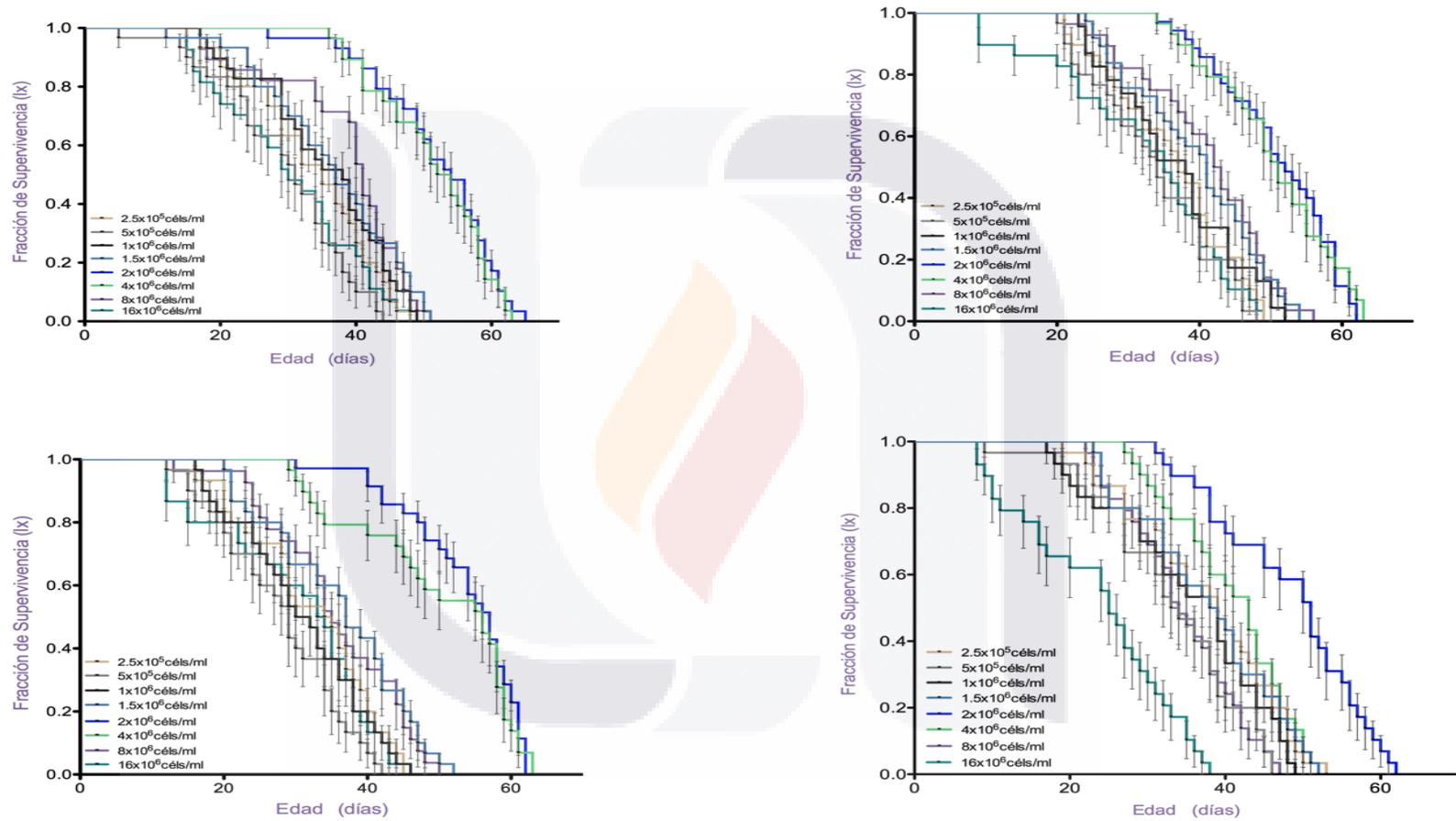


Figura 8. Curvas de supervivencia según las diferentes temperaturas de exposición de los organismos. Utilizando la microalga *Nannochloropsis oculata*. En la gráfica se presentan los valores de la media \pm error estándar para cada grupo.

9.2 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS AGUDAS

9.2.1. PLOMO

Para la prueba de exposición aguda a Plomo II, se utilizaron rangos de concentración de 0.25, 0.5, 1, 2, 4 ppm. Los organismos se mantuvieron expuestos al tóxico por 48 h consecutivas. Se realizaron curvas de mortalidad utilizando las técnicas de regresión logística de tipo Logit binomial, y regresión de ajuste lineal Probit. El método Logit fue utilizado para calcular los valores de las concentraciones letales 1, 10, y 50. En la figura 9-A,C,E,G se muestran las gráficas de regresión binomial Logit, donde se describe el resultado de mortalidad en función de la concentración del tóxico por medio de una curva sigmoidea. Mientras que en 9-B,D,F,H se muestran las gráficas de regresión logística utilizando la técnica Probit, donde las líneas sólidas representan la media estadística de las concentraciones letales medias, y las líneas punteadas representan los valores del intervalo de confianza (n=4).

En la Tabla 6 se muestran las concentraciones letales 1, 10 y 50 para cada tipo de tratamiento de temperaturas de cultivo y de exposición de *Alona cf. guttata* junto con su error estándar. Los valores de las concentraciones son los promedios de 6 réplicas (n=24) que fueron realizadas para cada tratamiento de temperaturas. No hubo diferencias significativas entre los valores de CL_{50} , lo que significa que la diferencia de temperatura de cultivo a la de exposición no afecta la toxicidad del tóxico plomo en *Alona cf. guttata*.

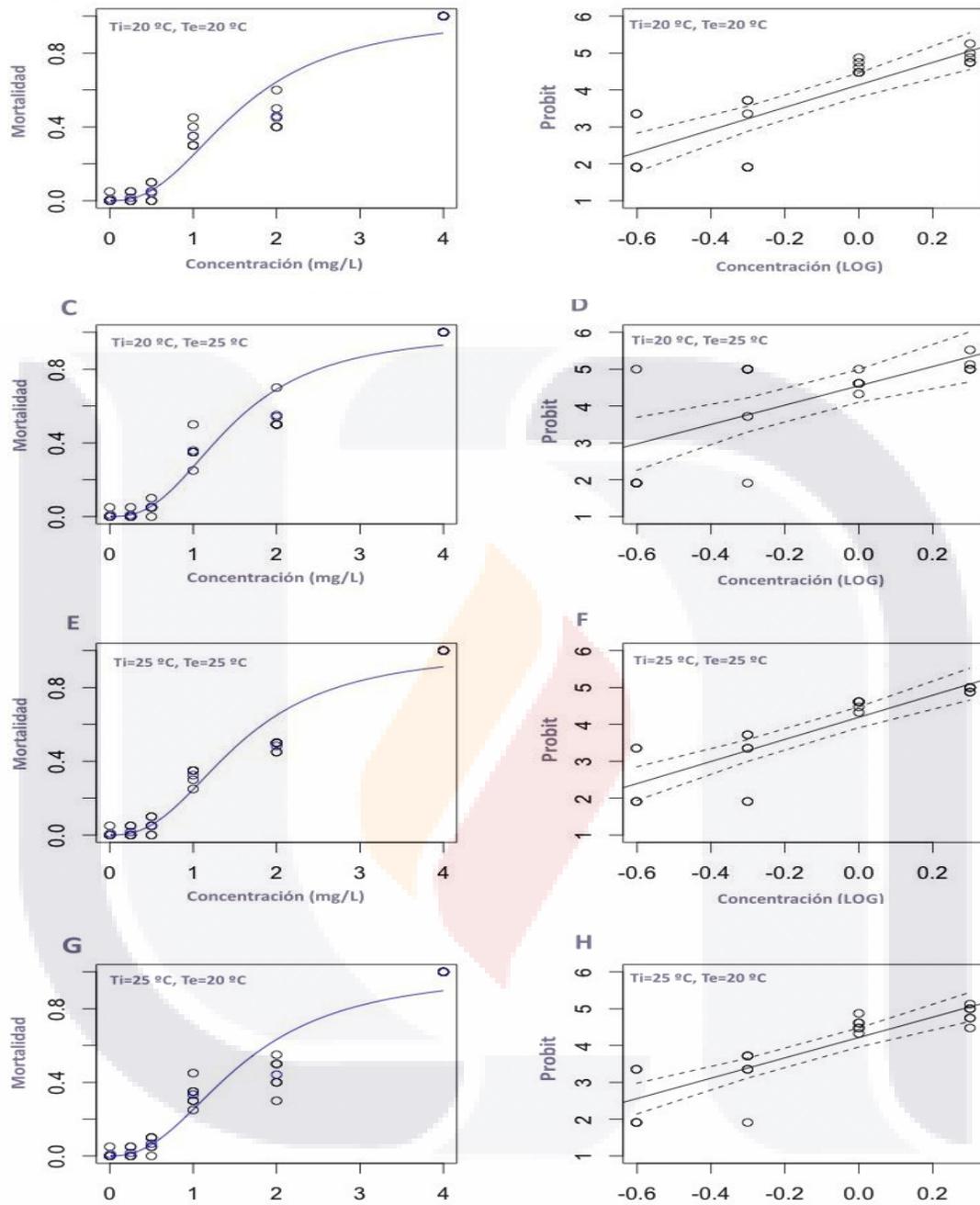


Figura 9. Curvas de regresión logística Logit y regresión de ajuste lineal Probit para exposición a Plomo II. A, C, E, G- Curvas de regresión logística tipo Logit Binomial. B, D, F, H- Curvas de regresión logística de ajuste lineal Probit. Paquete estadístico drm, Programa estadístico R Project, interfase RStudio. (Tc= Temperatura de cultivo, Te= Temperatura de exposición).

Tabla 6. Resumen de resultados de pruebas agudas con *Alona cf. guttata* por exposición a Plomo II.

Temperatura cultivo (°C)	Temperatura Exposición (°C)	CL ₁ (ppm) ± error estándar	CL ₁₀ (ppm) ± error estándar	CL ₅₀ (ppm) ± error estándar
20	20	0.2701 ± 0.0788	0.6739 ± 0.1344	1.5797 ± 0.1605
20	25	0.2763 ± 0.0699	0.6508 ± 0.0823	1.4567 ± 0.063
25	25	0.2693 ± 0.0768	0.6671 ± 0.1108	1.5647 ± 0.0738
25	20	0.2383 ± 0.0470	0.639 ± 0.0751	1.5934 ± 0.1246

CL= Concentración letal. Valor P= 0.2506, Estadístico Kruskal-Wallis= 4.102

9.2.2 DELTAMETRINA

Para la prueba de exposición aguda a Deltametrina, se utilizaron rangos de concentración de 0.075, 0.095, 0.11, 0.125 y 0.135 ppm, Los organismos se mantuvieron expuestos al tóxico por 48 h consecutivas. Se realizaron curvas de mortalidad utilizando las técnicas de regresión logística de tipo Logit binomial, y regresión de ajuste lineal Probit. El método Logit fue utilizado para calcular los valores de las concentraciones letales. En la figura 10-A,C,E,G se muestran las gráficas de regresión binomial Logit, donde se describe el resultado de mortalidad en función de la concentración del tóxico por medio de una curva sigmoidea. Mientras que en 10-B,D,F,H se muestran las gráficas de regresión logística utilizando la técnica Probit, donde las líneas sólidas representan la media estadística de las concentraciones letales medias, y las líneas punteadas representan los valores del intervalo de confianza. En la Tabla 7 se muestran las concentraciones letales 1, 10 y 50 para cada tipo de tratamiento de temperaturas de cultivo y de exposición de *Alona cf. guttata* junto con su error estándar. Los valores de las concentraciones son los promedios de 6 replicas (n=24) que fueron realizadas para cada tratamiento de temperaturas. Se encontró una diferencia significativa entre los valores de CL₅₀ para el tratamiento de Temperatura de Cultivo a 20 °C y de Temperatura de Exposición a 25 °C, que difiere con respecto al resto de los tratamientos. Significa que al incrementar la temperatura de exposición en un organismo aclimatado a una temperatura inferior, el organismo resulta ser más sensible al tóxico deltametrina por lo que se genera un efecto tóxico mayor con respecto a los demás tratamientos de temperatura.

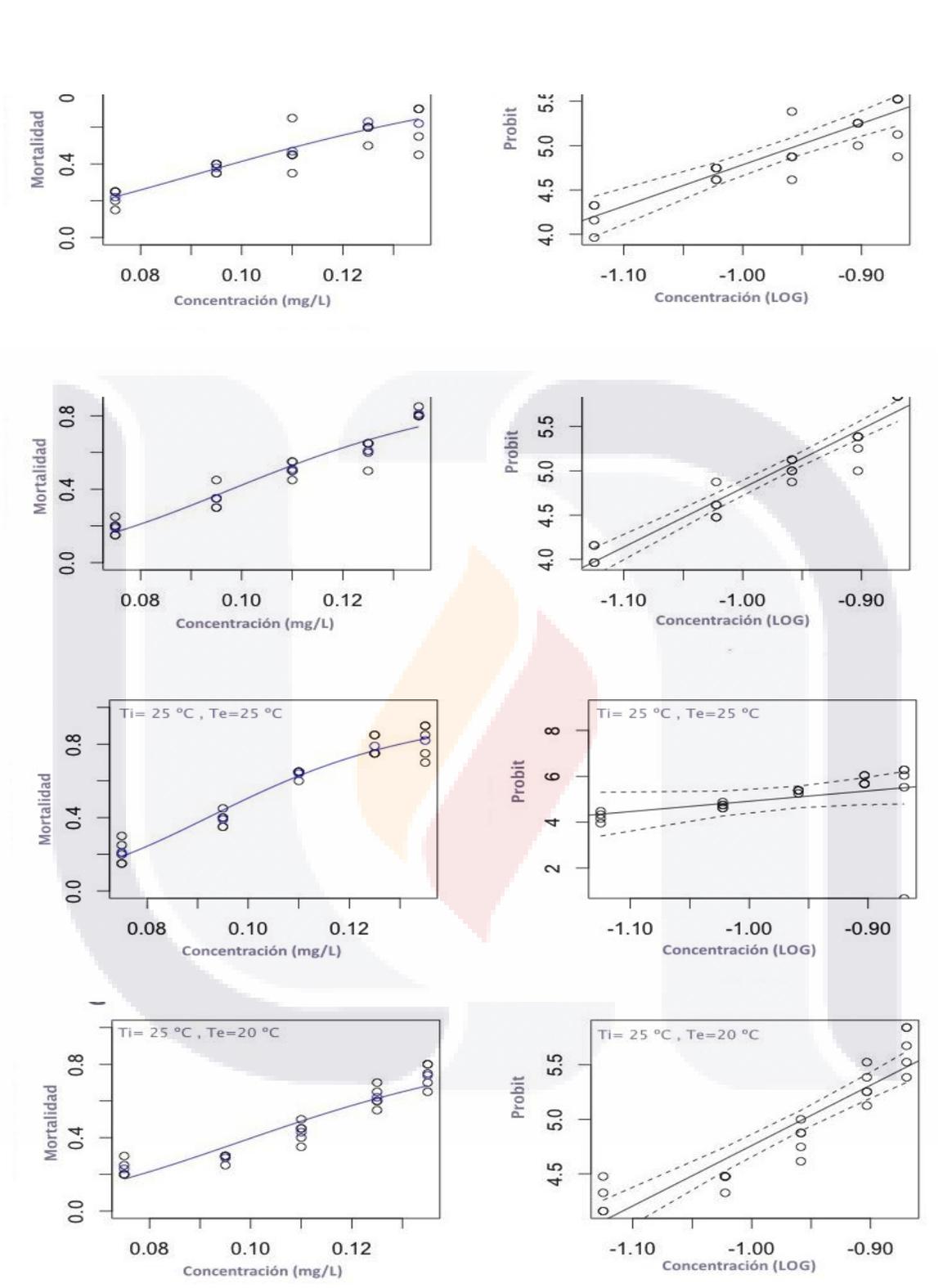


Figura 10. Curvas de regresión logística logit y regresión de ajuste lineal Probit para exposición a Deltametrina. A, C, E, G- Curvas de regresión logística tipo Logit Binomial. B, D, F, H- Curvas de regresión logística de ajuste lineal Probit. Paquete estadístico drm, Programa estadístico R Project, paquete estadístico drc, interfase RStudio. (Tc= Temperatura de cultivo, Te= Temperatura de exposición).

Tabla 7. Resumen de resultados de pruebas agudas con *Alona cf. guttata* por exposición a Deltametrina.

Temperatura cultivo (°C)	Temperatura Exposición (°C)	CL ₁ (ppm) ± error estándar	CL ₁₀ (ppm) ± error estándar	CL ₅₀ (ppm) ± error estándar
20	20	0.0253 ± 0.0074	0.054 ± 0.0062	0.1160 ± 0.0107
20*	25*	0.0390 ± 0.0043	0.066 ± 0.0041	0.0863 ± 0.0060
25	25	0.0368 ± 0.0063	0.062 ± 0.0050	0.1005 ± 0.0025
25	20	0.0347 ± 0.0033	0.0636 ± 0.0030	0.1113 ± 0.0020

CL= Concentración letal. Valor P= 0.0091, Estadístico Kruskal-Wallis= 11.56

9.2.3 VINCLOZOLIN

Se llevó a cabo un método de prueba para determinar las concentraciones letales 1, 10 y 50, para Vinclozolin en *Alona cf. guttata* utilizando los siguientes rangos de concentraciones: 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 y 1 ppm. Los organismos no resultaron ser sensibles al tóxico a estas concentraciones, por lo que se incrementaron los rangos de concentración y se repitió el procedimiento para la prueba de toxicidad aguda bajo los siguientes rangos de concentración: 1, 5, 10 ppm; No se obtuvieron resultados de mortalidad. Concentraciones más altas a las utilizadas en estas pruebas no se consideran relevantes ambientalmente, por lo que se suspendieron las pruebas toxicológicas con éste tóxico.

9.3. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CRÓNICAS

9.3.1. PLOMO

Para las pruebas de exposición crónica a Plomo II, se utilizaron un rango de concentraciones equivalentes a 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 de la CL₅₀ para este tóxico en *Alona cf. guttata*. La prueba crónica se realizó tipo tabla de vida, por lo que se midieron los parámetros demográficos: supervivencia (lx), Tiempo generacional (G), Tasa neta de reproducción (R₀), Fecundidad

específica por edad (m_x), Expectativa de vida al nacer (e_0) y Tasa intrínseca de crecimiento (r). En la figura 11 se muestran los resultados para cada parámetro por efecto de la concentración del tóxico. Se realizó el análisis estadístico que corresponde a un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

En la gráfica A, se obtiene que la supervivencia decrece a medida que aumenta la concentración de exposición al tóxico en comparación con el control negativo, donde los organismos tienen un tiempo de vida media aproximado de 20 días, mientras que bajo la concentración más alta de exposición, el tiempo de supervivencia fue de aproximadamente 10 días. En la figura 11B, se muestra como el tiempo generación en los organismos expuestos al tóxico disminuye el equivalente a la mitad del valor que se obtuvo con los organismos del control negativo. Así mismo, se observa en la gráfica C que la tasa neta de reproducción disminuye de manera drástica a al menos un cuarto de la reproducción normal del organismo en condiciones favorables. Lo que se muestra en las figuras 11B y C, indica que *Alona cf. guttata* al estar bajo condiciones de estrés por intoxicación con plomo, implementa una estrategia de supervivencia donde acorta sus tiempos generacionales, pero con menos huevos por camada por cada hembra. En la figura 11D, se muestra la fecundidad específica por edad, y se observa que ésta se reduce de manera drástica al estar el organismo en contacto con el tóxico. Dentro de la figura 11E, se observa el comportamiento del organismo en cuanto a la esperanza de vida al nacer, por lo que a concentraciones más elevadas del tóxico se observa que el valor correspondiente a éste parámetro disminuye de manera considerable. En la figura 11F, que corresponde a la tasa intrínseca de crecimiento, se observan valores negativos para las 3 concentraciones más altas utilizadas en la prueba, lo que indica que no solo se redujo el tiempo generacional bajo estas condiciones, sino que se registró mortandad de los organismos al estar expuestos al plomo.

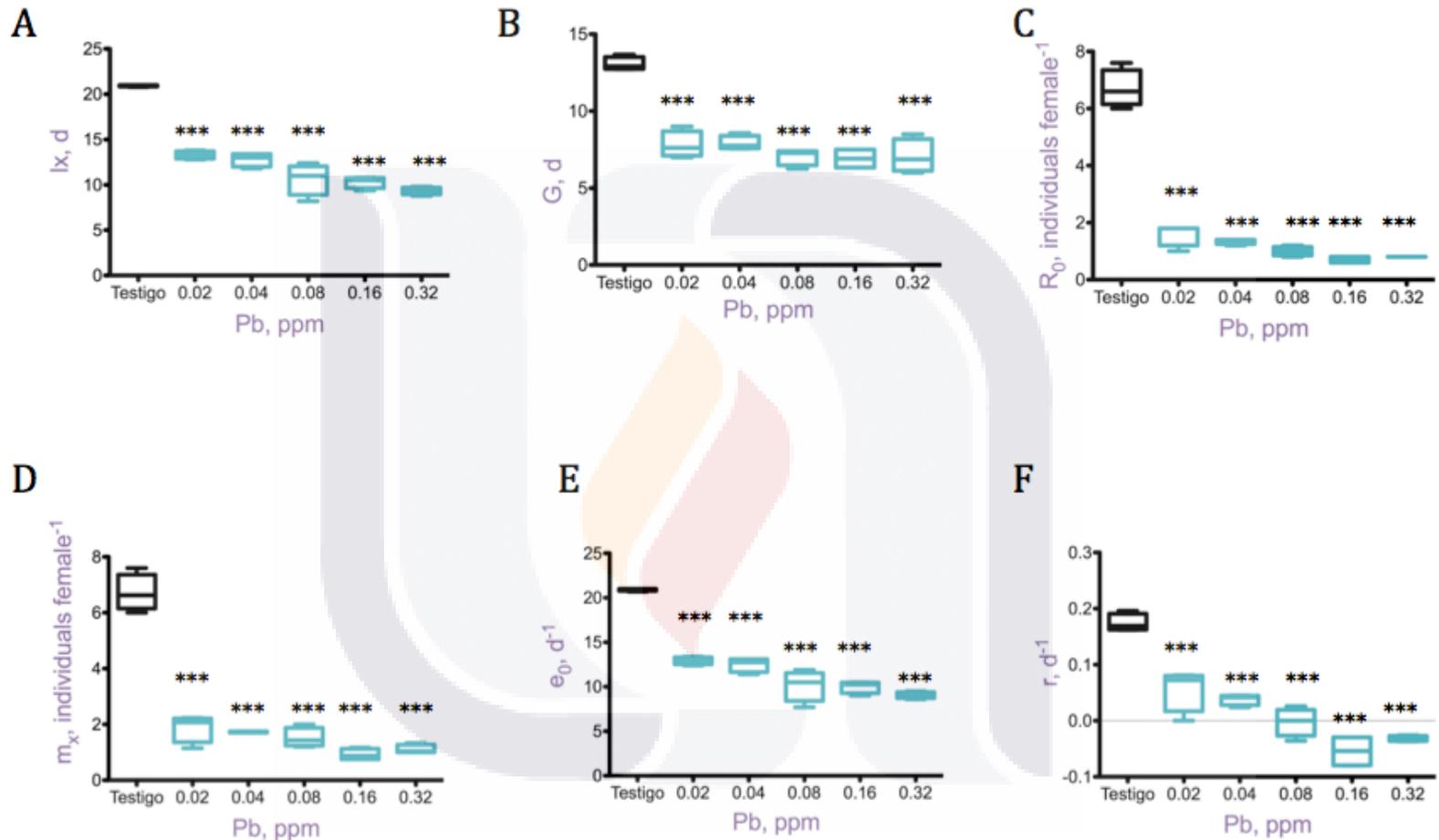


Figura 11. Resultados de exposición crónica a Plomo II de *Alona cf. guttata*

(A) l_x = supervivencia en días. **(B)** G = Tiempo generacional en días. **(C)** R_0 = Tasa neta de reproducción, por hembra. **(D)** m_x = Fecundidad específica por edad. **(E)** e_0 = expectativa de vida al nacer. **(F)** r = Tasa intrínseca de crecimiento. Valor $p < 0.0001$, $F = 220.4$ Prueba de comparación múltiple de Tukey. (Resultados del ANOVA en Anexo). Programa estadístico GraphPad Prism versión 5.0a para Mac Os X. Existen diferencias significativas respecto al control

Con base en los los registros de supervivencia obtenidos de las pruebas crónicas, se realizó la curva de supervivencia que se muestra en la figura 12, donde se obsevan las medias de los valores obtenidos por cada réplica de concentración, siendo que en las concentraciones de 0.02 y 0.04 ppm (equivalentes a 1/80 y 1/40 de la CL₅₀, respectivamente) se obtuvieron registros de supervivencia de algunos organismos que fueron similares a los del control negativo, sin embargo, la mayoría de los organismos registraron mortalidad entre los primeros días de la exposición crónica.

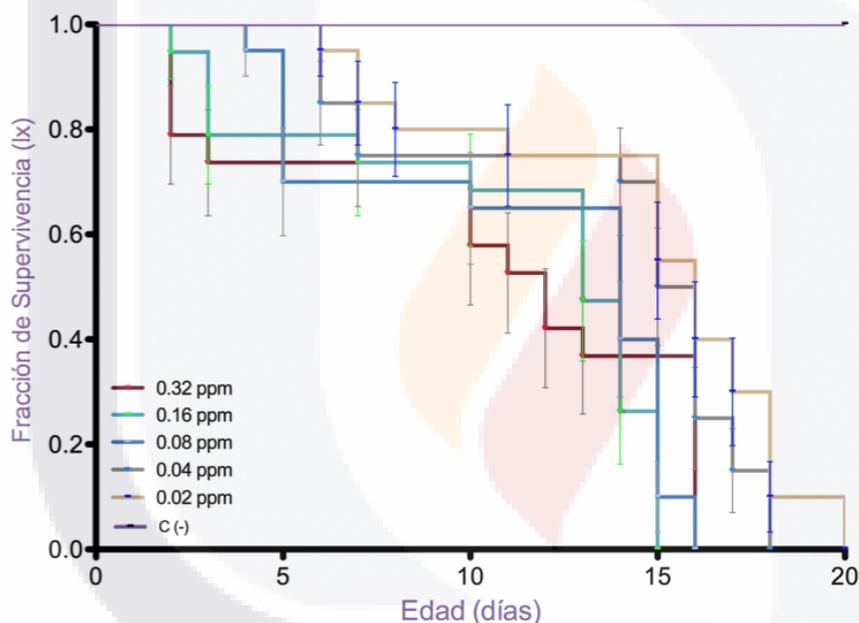


Figura 12. Curva de supervivencia de *Alona cf. guttata* para el tóxico Plomo. En la gráfica se presentan los valores de la media ± desviación estándar para cada grupo.

9.3.2. DELTAMETRINA

Para las pruebas de exposición crónica a Deltametrina, se utilizaron un rango de concentraciones equivalentes a 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 de la CL₅₀ en *Alona cf. guttata*. La prueba crónica se realizó tipo tabla de vida, por lo que se midieron los parámetros demográficos: supervivencia (Ix), Tiempo

generacional (G), Tasa neta de reproducción (R_0), Fecundidad específica por edad (m_x), Expectativa de vida al nacer (e_0) y Tasa intrínseca de crecimiento (r). En la figura 13 se muestran los resultados para cada parámetro por efecto de la concentración del tóxico. Se realizó el análisis estadístico que corresponde a un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. En la figura 13A, se obtiene que la supervivencia decrece a medida que aumenta la concentración de exposición al tóxico en comparación con el control negativo, donde los organismos tienen un tiempo de vida media aproximado de 21 días, mientras que bajo la concentración más alta de exposición, el tiempo de supervivencia fue de poco menos de 10 días. En la figura 13B, se muestra como el tiempo generacional en los organismos expuestos al tóxico disminuye aproximadamente a la mitad del valor que se obtuvo con los organismos del control negativo. Así mismo, se observa en la figura 13C que la tasa neta de reproducción tiene un valor cercano al cero, lo que implica un gran contraste frente al valor del control negativo. Dentro de las figuras 13B y C, se observa que *Alona cf. guttata* al estar bajo condiciones de estrés por intoxicación con deltametrina, reduce el tiempo generacional, pero a diferencia de la intoxicación por plomo, con el tóxico deltametrina se observa que la cantidad de neonatos nacidos por hembra es muy bajo. En la figura 13D, se muestra la fecundidad específica por edad, y se observa que ésta se reduce de manera drástica al estar el organismo en contacto con el tóxico, de modo que al relacionar ésta figura con la 13C, se confirma que para las concentraciones más altas de deltametrina la cantidad de huevos por hembra es cercano a cero, por lo que se registra una fecundidad mínima en los organismos. Dentro de la figura 13E, se observa el comportamiento del organismo en cuanto a la esperanza de vida al nacer, esto quiere decir que a concentraciones más elevadas del tóxico se observa que el valor correspondiente a éste parámetro disminuye a menos de la mitad del valor obtenido en el control negativo. En la figura 13F, que corresponde a la tasa intrínseca de crecimiento, se observan valores negativos para las 4 concentraciones más altas utilizadas en la prueba, lo que indica que además de

reducirse el tiempo generacional hubo una gran cantidad de mortalidad entre los organismos expuestos a deltametrina.



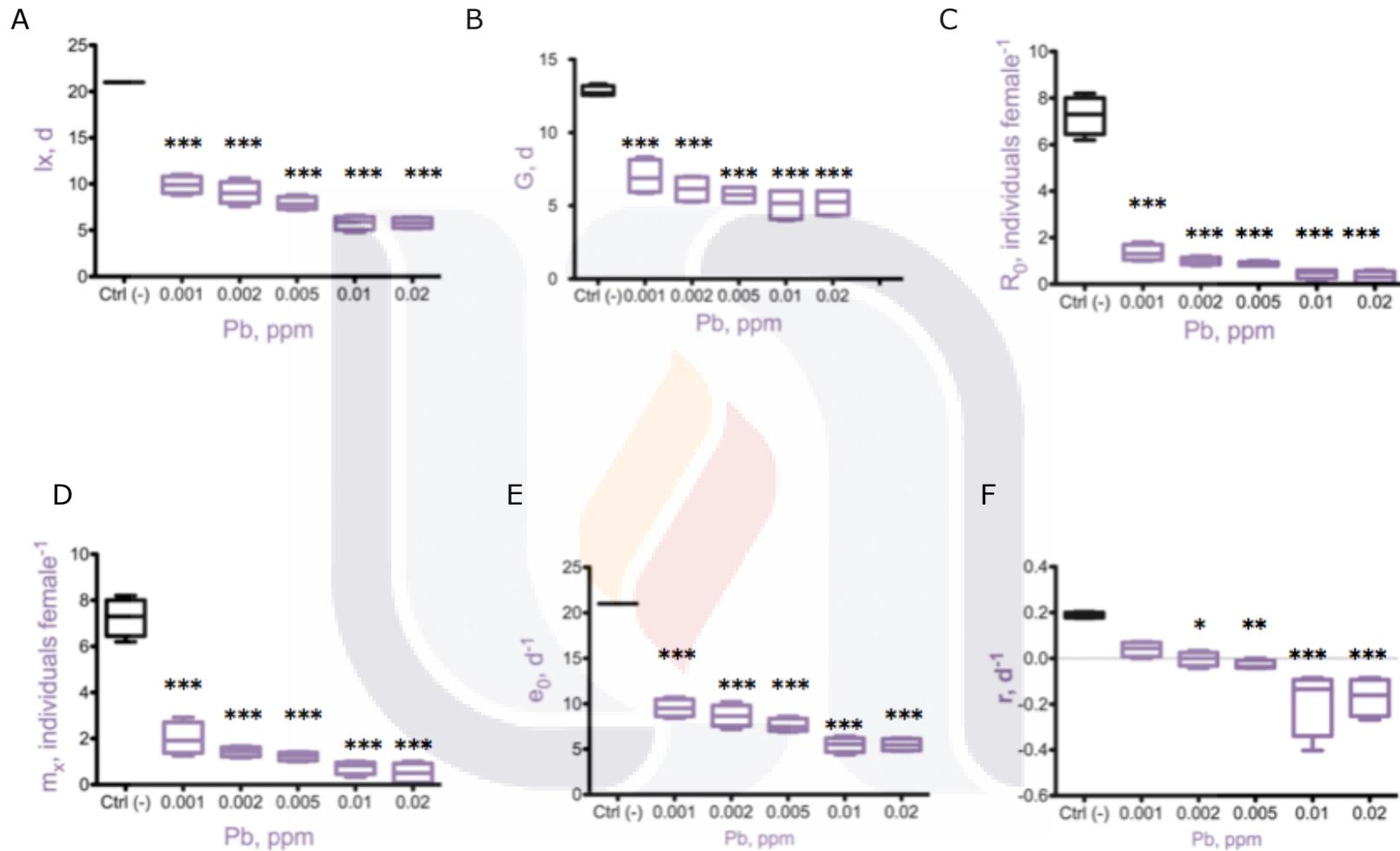


Figura 13. Resultados de exposición crónica a Deltametrina de *Alona cf. guttata*
(A) l_x = supervivencia en días. **(B)** G = Tiempo generacional en días. **(C)** R_0 = Tasa neta de reproducción, por hembra. **(D)** m_x = Fecundidad específica por edad. **(E)** e_0 = expectativa de vida al nacer. **(F)** r = Tasa intrínseca de crecimiento. Valor $p < 0.0001$. $F = 220.4$. Prueba de comparación múltiple de Tukey. (Resultados del ANOVA en Anexo). Programa estadístico GraphPad Prism versión 5.0a para Mac Os X.

De acuerdo a los registros de supervivencia obtenidos de las pruebas crónicas, se realizó la curva de supervivencia que se muestra en la Figura 14, donde se observan las medias \pm los valores de desviación estándar obtenidos por cada replica de concentración (n=4). Se obtuvo que la mayoría de los organismos sufrieron mortalidad en los primeros días de la exposición crónica obteniendo la mayor incidencia de mortandad alrededor de los 10 días.

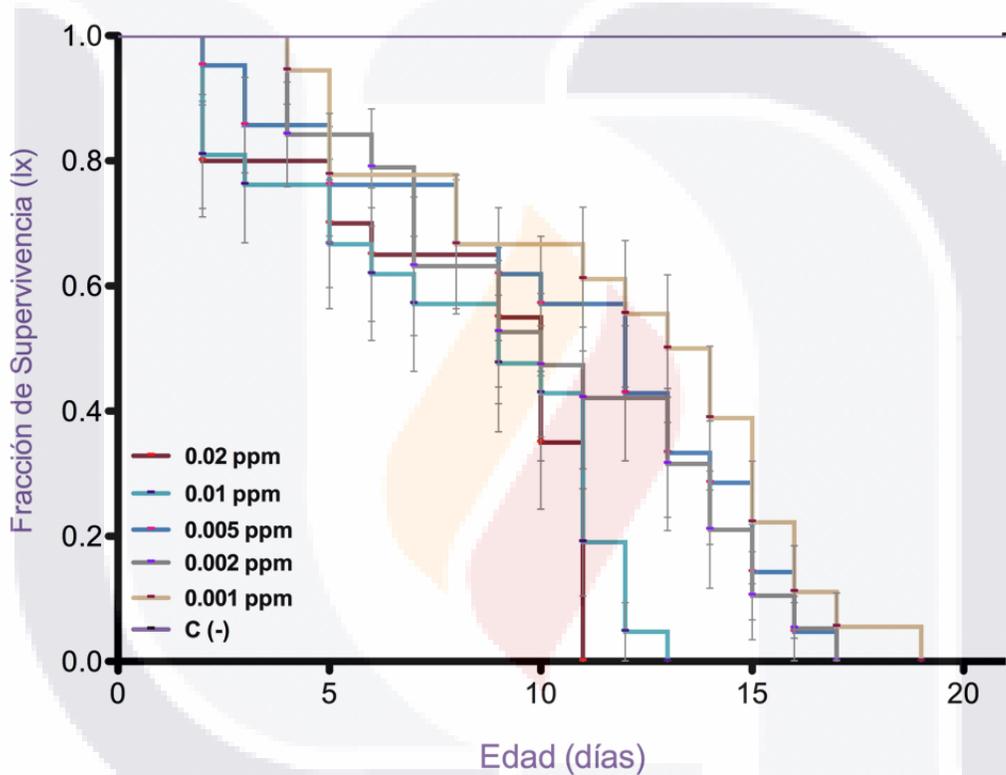


Fig. 14. Gráfica de supervivencia *Alona cf. guttata* para el tóxico Deltametrina. En la gráfica se presentan los valores de la media \pm desviación estándar para cada grupo.

9.4 RESULTADOS DE LOS BIOMARCADORES

9.4.1 PLOMO

Para evaluar los efectos de toxicidad del plomo II en *Alona cf. guttata*, se midieron las moléculas de carbohidratos, lípidos y proteínas. Los organismos fueron expuestos al tóxico por 24 h en los rangos de concentración de 0.02, 0.04, 0.08, 0.16 y 0.32 ppm.

En la figura 15, se muestra en A, la gráfica de contenido de proteína por organismo al estar expuestos a las diferentes concentraciones de Plomo II, siendo que para las concentraciones de 0.16 y 0.32 se observa que éstas disminuyen casi completamente, mientras que para el rango de concentraciones de 0.02, 0.04 y 0.08, la concentración de proteína en los organismos se mantiene cercana al valor obtenido en el control negativo. En la gráfica 15B, se observa una tendencia similar en cuanto a la disminución de carbohidratos conforme se aumenta la concentración de plomo, de manera que para la concentración de 0.32 ppm, la disminución de carbohidratos por parte de *Alona cf. guttata* durante la intoxicación es casi completo. En la gráfica 15C, se observa la misma tendencia que en las macromoléculas anteriores, donde la cantidad de lípidos disminuye considerablemente al aumentarse las concentraciones del tóxico. Sin embargo, a diferencia de carbohidratos y proteínas, esta disminución ocurre de manera mas gradual, bajando los niveles de lípidos sin llegar a una cantidad inferior a los 0.2 microgramos, como sucede con carbohidratos y proteínas.

En la figura 15D, se muestra el contenido calórico por organismo, al estar expuestos al tóxico, se observa que para las concentraciones de 0.16 y 0.32 éste se ve disminuido de manera dramática en comparación con el valor del control negativo.

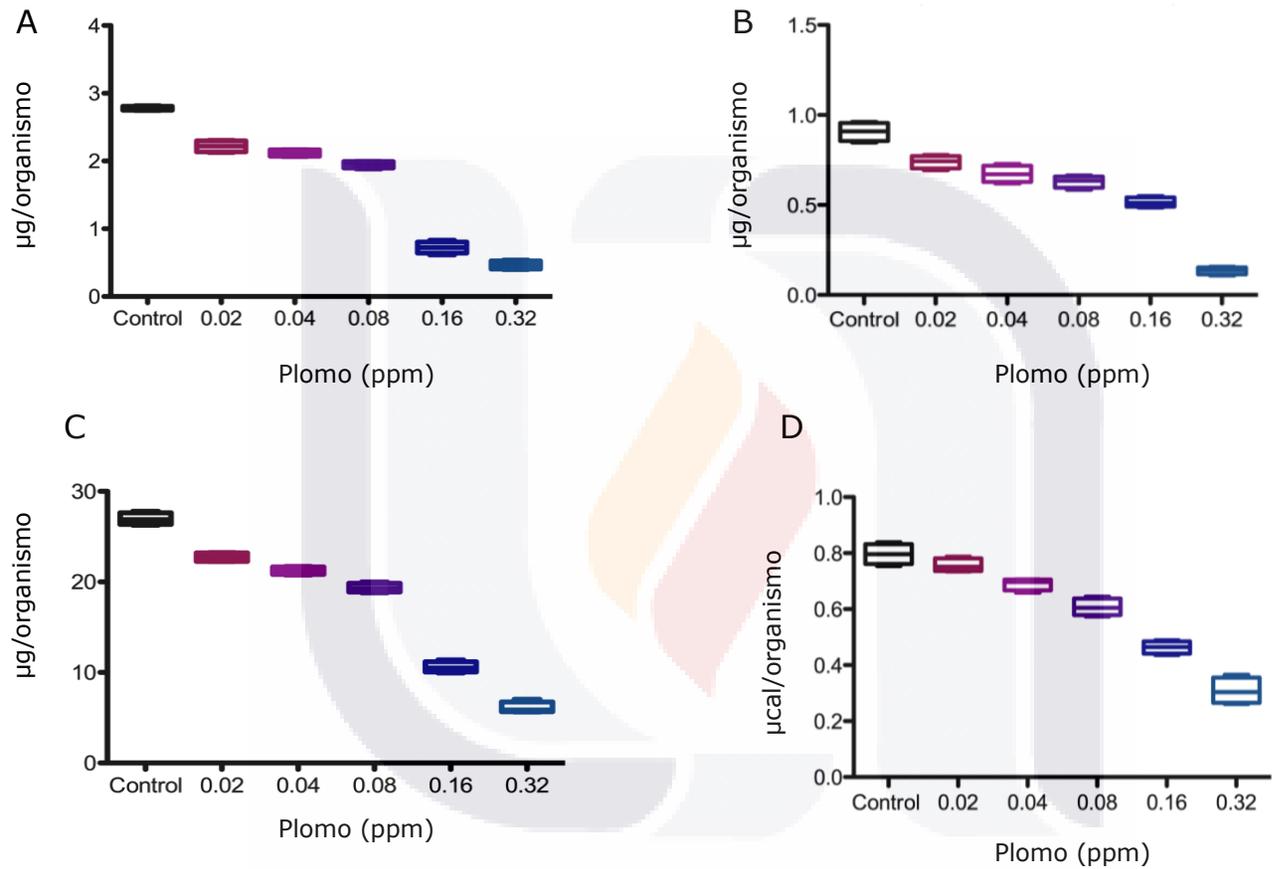


Figura 15. Contenido de moléculas A- Proteínas, B- Lípidos, C- Carbohidratos y D- Contenido calórico en exposición a plomo II. En las gráficas se presentan los valores de la media \pm desviación estándar para cada grupo.

9.4.2 DELTAMETRINA

Para evaluar los efectos de toxicidad del Deltametrina en *Alona* cf. *guttata*, se cuantificaron las moléculas de, carbohidratos, lípidos y proteínas. Los organismos fueron expuestos al tóxico por 24 h en los rangos de concentración de 0.001, 0.002, 0.005, 0.01 y 0.02 ppm.

En la figura 16, se muestra en A, la gráfica de contenido de proteína por organismo al estar expuestos a las diferentes concentraciones de Deltametrina, siendo que para las concentraciones de 0.005, 0.01 y 0.02 se observa que éstas disminuyen notablemente, mientras que para las concentraciones de 0.001, y 0.002, la concentración de proteína en los organismos se mantiene en valores cercanos a los obtenidos en el control negativo. En la figura 16B, se observa una tendencia similar en cuanto a la disminución de carbohidratos conforme se aumenta la concentración de deltametrina, de manera que para la concentración de 0.01 y 0.02 ppm, la disminución de carbohidratos por parte de *Alona* cf. *guttata* durante la intoxicación es casi completa. En la figura 16C, se observa la misma tendencia que en las macromoléculas anteriores, donde la cantidad de lípidos disminuye de manera considerable al aumentarse las concentraciones del tóxico. Se observa que la cantidad de lípidos disminuye más bajo la concentración de 0.02 ppm, en comparación al resto de concentraciones utilizadas.

En la figura 15D, se muestra el contenido calórico por organismo, al estar expuestos al tóxico, se observa que para las concentraciones de 0.005, 0.01 y 0.02 éste se ve disminuido a la mitad del valor obtenido en el control negativo.

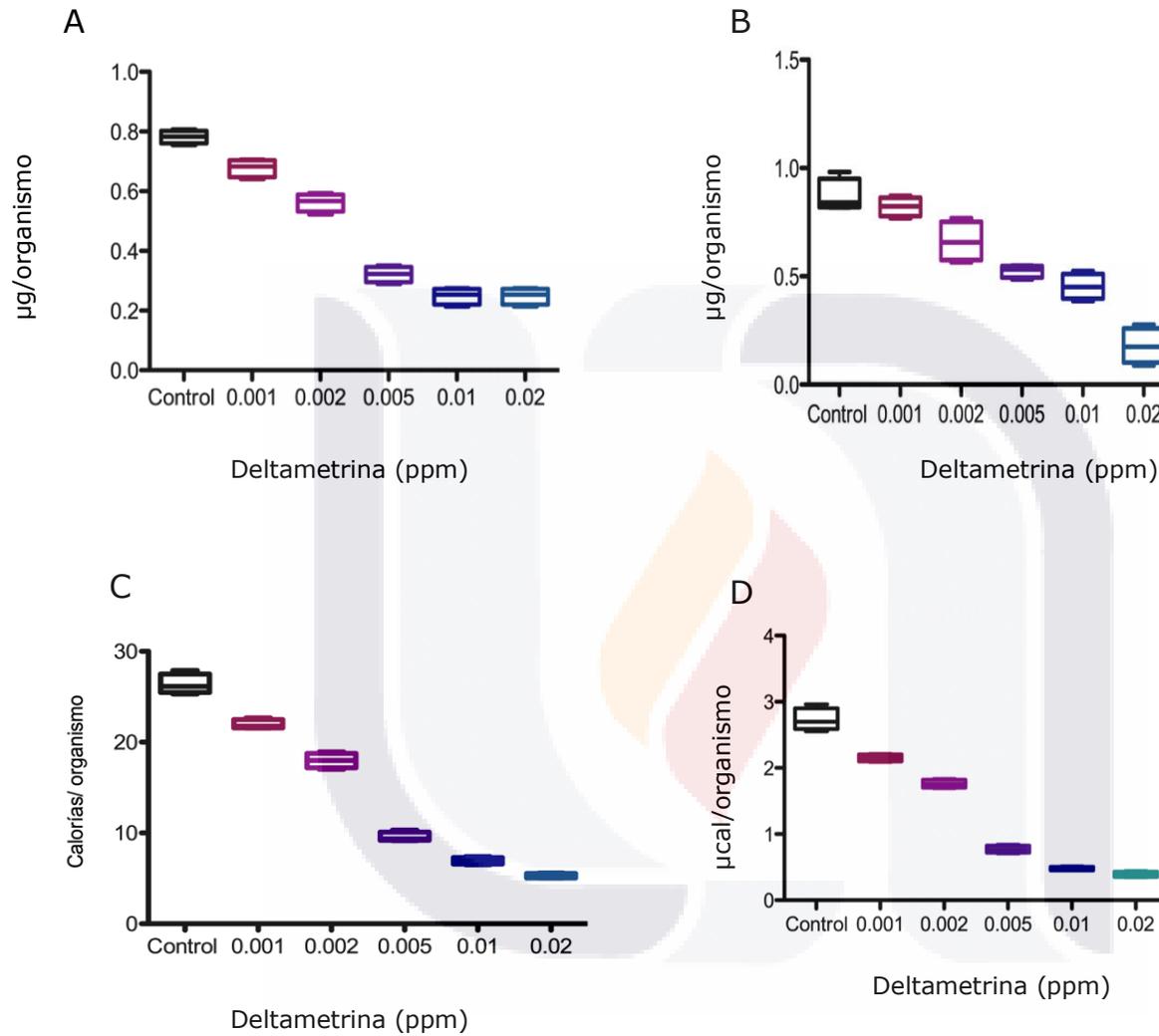


Figura 16. Contenido de moléculas A- Proteínas, B- Lípidos, C- Carbohidratos y D- Contenido calórico, en exposición a deltametrina. En las gráficas se presentan los valores de la media \pm desviación estándar para cada grupo.

9.4.3 CE₅₀ PARA PLOMO Y DELTAMETRINA

Se determinaron las concentraciones efectivas 10, 50 y 90 de plomo y deltametrina para cada macromolécula determinada. En las tablas 8 y 9 se observan los valores de éstas concentraciones.

Tabla 8. Concentraciones Efectivas Medias (CE₅₀) de los tóxicos plomo y deltametrina en Carbohidratos, Lípidos y Proteínas ± Error estándar.

Concentración Efectiva Media (CE ₅₀)		
	Deltametrina (ppm)	Plomo (ppm)
CARBOHIDRATOS	0.0027 ± 0.0067	0.2301 ± 0.1104
LÍPIDOS	0.0023 ± 0.0001	0.2050 ± 0.0888
PROTEÍNAS	0.0023 ± 0.0001	0.1428 ± 0.0737

Paquete estadístico drm, interfase R Studio.

Tabla 9. Concentraciones Efectivas 10 y 90 (CE₁₀, CE₉₀) de los tóxicos plomo y deltametrina en Carbohidratos, Lípidos y Proteínas ± Error estándar.

	MACROMOLÉCULA	CE ₁₀	CE ₉₀
PLOMO	CARBOHIDRATOS	0.1656	0.3196
	LÍPIDOS	0.0314	0.1338
	PROTEÍNAS	0.0239	0.8524
DELTAMETRINA	CARBOHIDRATOS	0.0053	0.7730
	LÍPIDOS	0.0007	0.0070
	PROTEÍNAS	0.0006	0.0089

Paquete estadístico drm, interfase R Studio.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Alona cf. guttata ha demostrado ser un organismo modelo para pruebas de toxicidad, debido a sus características morfológicas y fisiológicas, tiene ventajas frente a otros organismos de prueba ya que es capaz de vivir en la interfase agua suelo, tiene la capacidad de filtrar su alimento y raspar superficies para obtenerlo, lo que resultaría en un beneficio para la detección de contaminantes, ya que *Alona cf. guttata* podría detectar tóxicos que se encuentren en el sedimento o suspendidos.

Este trabajo contribuye a las primeras pruebas de toxicidad agudas y crónicas implementadas en *Alona cf. guttata*, además de ser la primera vez que se evalúa la reasignación energética en este organismo mediante los biomarcadores de exposición que son la determinación de carbohidratos, lípidos y proteínas, que además es el primer desarrollo implementado en quidóridos.

10.1 TABLA DE VIDA

Se demostró que *Alona cf. guttata* tiene un ciclo de vida parecido a los rangos reportados para otros quidóridos (Murugan y Job, 1982; Venkataraman, 1990), bajo condiciones similares, ya que se utilizaron microalgas ya reportadas y utilizadas para estudios de tabla de vida y protocolos de toxicidad en cladóceros.

El cultivo de *Alona cf. guttata* con levadura no fue modelo adecuado para el mantenimiento del organismo, la tasa neta de reproducción fue de 0, y el tiempo de vida media entre 2 y 4 días (n=24); esto puede ser debido a

que la energía asimilable que provee la levadura pudo no ser suficiente para *A. cf. guttata*, además, es posible que debido a las características morfológicas del organismo, le resultase difícil ingerir la levadura, ya que ésta llega a tener un diámetro de hasta 10 μm , el cual para *A. cf. guttata* podría resultar ser grande.

Con el cultivo con *Pseudokirchneriella subcapitata* sucedió algo similar, esta micro alga tiene un diámetro que mide entre 10-20 μm , además su estructura es en forma de media luna, por lo que se observó que bajo concentraciones superiores a 1 millón de células por mililitro, el tiempo de vida media decrece dramáticamente, siendo que para los rangos de concentración entre 250,000 y 2 millones, el tiempo de vida media es de aproximadamente 12-16 días, que representa menos de la mitad del valor reportado de supervivencia para otros cladóceros (13 - 60 días (Martínez-Jerónimo et al., 1994; Dos Santos-Silva et al., 2014), y para lo reportado en este trabajo de *Alona cf. guttata* bajo el cultivo con otros tipos de alimento (más de 50 días).

Se utilizaron 4 factores en la medición de 6 respuestas demográficas, y al analizarse éstos datos utilizando las tablas 4 y 5, que muestran los valores de las condiciones de cultivo utilizando *Nannochloropsis oculata* y *Chlorella vulgaris* respectivamente, se determina que los factores temperatura y tipo de sustrato no modifican de manera significativa las respuestas de los parámetros demográficos, sin embargo, es la concentración del alimento la que determina la variación entre las respuestas observadas.

La elección de las temperaturas de cultivo para el estudio se basó en los protocolos de toxicidad (20°C) y se buscó medir estos parámetros a temperatura ambiente, sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que *Alona cf. guttata* podría ser una especie euritérmica.

En cuanto al tipo de sustrato, el sustrato artificial contiene una fuente de materia orgánica que es una fracción de abono, además de contener arena y sílice con el fin de proporcionarle al organismo un medio para poder anclarse.

Mientras que el sustrato de suelo de jardín, proporciona una cantidad más alta de materia orgánica, y al tener partículas sedimentadas de mayor tamaño, permite al organismo mantenerse anclado a éstos y además le proporciona un espacio para filtrar bacterias que puedan encontrarse en el sedimento, es por esto, que entre ambos sustratos se observo una ligera diferencia en cuanto a los valores de supervivencia para los diferentes tratamientos de alimento y concentraciones de alimento.

10.2 PRUEBAS AGUDAS

10.2.1 PLOMO

Los resultados de las pruebas agudas para la exposición a plomo, demostraron que *Alona cf. guttata* es un organismo sensible al tóxico, de manera similar a los organismos de prueba actualmente utilizados. El cladóceros *Daphnia magna*, reporta un valor de CL_{50} de 1.88 ppm a 48 h (Offem et al., 2008), para *Daphnia pulex* es de 5.1 ppm a 48 h (Mount y Norberg, 1984). Mientras que los rotíferos *Brachionus calyciflorus* y *Brachionus plicatilis* reportan valores de CL_{50} de 0.248 ppm y 4 ppm, respectivamente (Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2013; Snell et al., 1991).

Los tratamientos de temperatura utilizados para las pruebas agudas, no modificaron de manera significativa los valores obtenidos de concentración letal media ($p=0.2506$, Kruskal-Wallis=4.102), lo que significa que el cambio entre éstas temperaturas no afecta la sensibilidad de *Alona cf. guttata* al plomo.

10.2.2 DELTAMETRINA

De acuerdo a los resultados obtenidos, se obtiene que *Alona cf. guttata* es un organismo sensible al pesticida, sin embargo, existen organismos de

prueba que actualmente se utilizan, que han resultado ser más sensibles al tóxico. Los cladóceros *Ceriodaphnia quadrangula* y *Daphnia similis* reportan un valor de CL₅₀ de 1.3×10^{-5} y 8.7×10^{-4} , respectivamente (Premkumar y Mathavan, 1967; Presing, 1989).

En cuanto a los tratamientos de temperatura (de cultivo y exposición), la sensibilidad de *Alona* cf. *guttata* fue modificada en el tratamiento donde se aumento la temperatura de cultivo a la de exposición, esto se reflejó en una disminución significativa del valor de CL₅₀, lo que indica que cuando se aclimata el organismo a una tempera menor a la de exposición, existe un aumento en la sensibilidad al tóxico deltametrina.

10.3 PRUEBAS CRÓNICAS

10.3.1 PLOMO

Se realizaron las pruebas crónicas evaluando parámetros demográficos tipo tabla de vida, para observar el efecto de la exposición crónica al plomo.

Entre los efectos observados en la supervivencia, se muestra en la figura 11 que cuando el organismo entra en contacto con el tóxico (0.02 ppm), ésta disminuye significativamente con respecto al control negativo, además, la supervivencia va disminuyendo conforme aumenta la concentración del tóxico (0.02-0.32 ppm). En cuanto al valor de la fecundidad específica por edad, éste decrece al estar el organismo en contacto con el tóxico, las hembras comienzan a disminuir la producción de neonatos por camada.

El tiempo generacional se acorta significativamente para cada concentración de tóxico a un valor aproximado de la mitad del valor obtenido en el control negativo que es de 13 días. Lo que significa que el tiempo que transurre entre los nacimientos de neonatos por hembra, es más corto con respecto a lo registrado por el grupo del control negativo. Además, la tasa neta de reproducción se reduce gradualmente en función de la concentración de

plomo (0.02-0.32 ppm), esto quiere decir que en comparación con el grupo del control negativo donde se obtienen entre 3-5 neonatos por día, ésta proporción disminuye en los grupos con tóxico, de manera que se registran nacimientos de entre 1-2 neonatos por día. Al observar el tiempo generacional y la tasa neta de reproducción es de suponer que la estrategia de supervivencia implementada por *Alona* cf. *guttata*, es la producción de neonatos en menor proporción, así como disminuir el tiempo entre camadas, invirtiendo mayor energía en el lapso de reproducción para poder continuar la especie en el medio adverso. La esperanza de vida al nacer es un parámetro relacionado con la supervivencia, debido a que la supervivencia se ve comprometida por la presencia del tóxico, así también la esperanza de vida al nacer es significativamente baja (14-8 días, en el rango de 0.02-0.32 ppm de plomo) en relación al grupo del control negativo (21 días).

Acerca de la tasa intrínseca de crecimiento poblacional, al registrarse datos de mortalidad entre los grupos expuestos a plomo, se obtienen valores negativos (-0.1), ya que no solo se consideran los valores disminuidos de la tasa neta de reproducción (menor a 2). La mortalidad registrada ocurre en las concentraciones más altas del tóxico (0.8-0.32 ppm).

10.2.2 DELTAMETRINA

La supervivencia del control negativo fue del 100%, mientras que el valor reportado de éste parámetro en los grupos expuestos al tóxico deltametrina fue significativamente inferior (menor a 10 días), disminuyendo gradualmente en función del aumento de concentración del tóxico (0.001- 0.02 ppm). La fecundidad específica por edad mostró que *Alona* cf. *guttata* restringe la producción de neonatos bajo condiciones adversas.

La tasa neta de reproducción en los grupos expuestos a deltametrina indica que en los valores de concentraciones elevadas (0.01 y 0.02 ppm), la reproducción tiene a no ocurrir bajo éstas condiciones desfavorables. Mientras

que el tiempo generacional muestra un comportamiento más acelerado que en el grupo del control negativo, esto sugiere y reafirma la teoría que la estrategia de supervivencia de *Alona cf. guttata* frente a un tóxico es disminuir el número de neonatos por hembra, además de acortar el tiempo generacional. Debido a que bajo las condiciones de toxicidad de medio *Alona cf. guttata* no logra sobrevivir, la esperanza de vida igualmente se reduce (5 - 10 días) siendo significativamente alta la diferencia de estos valores con respecto a lo obtenido en el grupo del control negativo (21 días).

Al no solo registrarse datos de reproducción cercanos a cero, si no que se registró mortalidad en los grupos expuestos a deltameterina, la gráfica para la tasa de crecimiento poblacional muestra valores negativos (-0.04), esto sucede para las 3 últimas concentraciones del tóxico (0.005, 0.01 y 0.02 ppm); lo que indica una toxicidad más alta que el plomo para *Alona cf. guttata*.

10.4 BIOMARCADORES

Se determinaron cuantitativamente las macromoléculas: carbohidratos, lípidos y proteínas, con el fin de evaluar la toxicidad del plomo y la deltametrina en el metabolismo del organismo. Por lo que se determinaron en grupos de organismos no expuestos al tóxico, para poder realizar la comparación.

Para plomo y deltametrina se obtuvo que las reservas de carbohidratos, lípidos y proteínas en los organismos, disminuyeron al estar en presencia de los tóxicos. Debido a que la reproducción de *Alona cf. guttata* fue más afectada que el parámetro de supervivencia, es de suponer que las reservas de energía fueron cambiadas según la necesidad del organismo, por lo que además se midió el contenido calórico y así tener más información sobre la inversión de energía que destina *A. cf. guttata* a la supervivencia.

Se calcularon los valores de EC_{50} , para ambos tóxicos y para cada una de las moléculas, siendo que el primer consumo de reservas es el de lípidos y

proteínas en intoxicación por deltametrina y de proteínas en intoxicación por plomo. En ambos casos las últimas reservas que se consumen son los carbohidratos. Esto podría explicarse suponiendo que en una exposición aguda con el tóxico, *A. cf. guttata* comienza un mecanismo de supervivencia donde modifica su distribución de energía a la producción constante de neonatos, por lo que ocuparía proteínas en la formación de nuevo organismo, y los lípidos acumulados para el crecimiento del organismo.

11. CONCLUSIONES

El presente trabajo constituye la primer contribución sobre el ciclo de vida de *Alona cf. guttata*, además de aportar información sobre las condiciones de cultivo para *A. cf. guttata*. Las mejores condiciones encontradas (Utilizando *Nannochloropsis occulata* a una concentración de 2,000,000 células/ml, a temperatura de 20 °C o 25 °C, en suelo de jardín o sustrato artificial), se determinaron mediante el uso de dos diferentes sustratos (artificial y suelo de jardín), siendo ambos favorables para los cultivos; además se utilizaron dos temperaturas diferentes (20 °C y 25 °C), las respuestas de reproducción y longevidad del organismo mantienen un rendimiento similar para ambas temperaturas. Estas respuestas también fueron modificadas por la concentración y tipo de alimento, siendo *Nannochloropsis occulata* y *Chlorella vulgaris* los alimentos óptimos, a concentraciones de 2 – 4 millones de células por mililitro.

Los resultados de las pruebas agudas demostraron que *Alona cf. guttata* es un organismo sensible a los tóxicos de prueba plomo y deltametrina, ya que los valores de CL₅₀ reportados en este trabajo, se han comparado con los obtenidos en estudios con otros cladóceros. Cabe mencionar que el presente trabajo aporta información sobre toxicidad de la deltametrina para organismos del género *Alona*.

En el estudio de toxicidad crónica se observó que los tóxicos plomo y deltametrina disminuyeron la tasa intrínseca de crecimiento, el número de neonatos por camada, así como el tiempo generacional; sin embargo, no parecen afectar la formación de los neonatos. Son sensibles a partir de la concentración que corresponde a 1/80 de la CL₅₀ (0.02 ppm para plomo y 0.001 ppm para deltametrina). Faltan estudios para conocer más detalles sobre el mecanismo de supervivencia de *Alona cf. guttata* y el mecanismo de toxicidad de cada uno de los tóxicos sobre este organismo.

La exposición aguda a plomo y deltametrina tiene un efecto directo en la reasignación de energía, la cuál se evaluó al determinar carbohidratos, lípidos y proteínas en organismos adultos de la misma edad, expuestos a diferentes concentraciones que representadas por fracciones de la CL₅₀ para cada tóxico (1/80, 1/40, 1/20, 1/10 y 1/5), dando como resultado variaciones en el contenido calórico de *Alona cf. guttata*, siendo que las reservas de estas moléculas, se consumían en mayor medida según el incremento en los rangos de concentración de cada tóxico.

Se recomienda a *Alona cf. guttata* como organismo modelo para pruebas de toxicidad aguda y crónica, ya que posee características fisiológicas que permiten medir las respuestas de toxicidad y evaluar el daño provocado en el organismo por causa de la intoxicación. Además, se podrá utilizar a este organismo para muestras de agua o de sedimento, ya que en ambos ambientes es posible el cultivo y mantenimiento de *Alona cf. guttata*.

Aún falta por comprender más acerca de los mecanismos de toxicidad aguda y crónica a nivel molecular, que ocurren dentro de *Alona cf. guttata* por los cuales se manifiestan las respuestas que hasta ahora han sido evaluadas. Es interesante suponer que se puedan adaptar otro tipo de análisis que permitan revelar interacciones entre sistemas metabólicos, sistemas enzimáticos y compuestos tóxicos con el fin de evaluar mecanismos supervivencia adoptadas por el organismo.

12. GLOSARIO

- Absorción: El proceso por el cual una sustancia entra al organismo.
- Ambiente: El entorno que afecta a los seres vivos y que condiciona sus circunstancias vitales.
- Bioacumulación: Proceso de acumulación de ciertos productos dentro de los organismos.
- Biomarcador: Son los cambios medibles, ya sean estos bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, que se asocian a la exposición a un tóxico.
- Biomonitorio: Son un conjunto de técnicas que permiten detectar compuestos tóxicos mediante el estudio de los organismos que habitan en el lugar. Basadas en la reacción y sensibilidad de distintos organismos vivos a diversas sustancias contaminantes presentes en un ecosistema.
- Bioindicador: son atributos de los sistemas biológicos que se emplean para descifrar factores de su ambiente. Las especies indicadoras son aquellos organismos que ayudan a descifrar cualquier fenómeno o acontecimiento relacionado con el estudio de un ambiente.
- Ecotoxicología: La ecotoxicología es la ciencia que estudia el destino y los efectos de los contaminantes en los ecosistemas y en los seres vivos, intentando explicar las causas y prever los riesgos probables.
- Cadena trófica: Es el proceso de transferencia de energía alimenticia a través de una serie de organismos, en el que cada uno se alimenta del precedente y es alimento del siguiente.
- Concentración efectiva media (EC_{50}): Concentración calculada estadísticamente, de una sustancia en un medio, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50% de los organismos de

experimentación de una población dada, bajo un conjunto de condiciones definidas.

- Concentración letal media (CL_{50}): Es la concentración obtenida estadísticamente, de una sustancia que se espera produzca la muerte durante la exposición o en un plazo definido, y que la mortalidad sea del 50% de los organismos expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado. El valor de las CL_{50} se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen.
- Contaminación: Es la introducción de un agente contaminante dentro de un medio natural, causando inestabilidad, desorden y también daños en el ecosistema.
- Prueba Aguda: Es una técnica de exposición aguda, donde se pone en contacto a un organismo con una sustancia, que ocurre durante un período de tiempo corto, bajo condiciones definidas. Se determina la inmovilidad o la mortalidad.
- Prueba crónica: Es una técnica de exposición crónica, donde se pone en contacto a un organismo con una sustancia, que ocurre durante un período de tiempo largo, bajo condiciones definidas. Se determinan diferentes respuestas del organismo al tóxico.
- Tóxico: Tóxico es todo aquel elemento o compuesto químico que, absorbido e introducido en el medio interno y metabolizado, es capaz de producir lesiones en los aparatos y sistemas orgánicos de la economía e incluso provocar la muerte.
- Toxicidad: La toxicidad es la capacidad de alguna sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él.

13. REFERENCIAS

1. Altinda, A., Borga, M., Yigit, S. y Baykan, Ö. (2008) The acute toxicity of lead nitrate on *Daphnia magna* Straus. *African Journal of Biotechnology* 7(23), pp. 4298-4300.
2. Alvarado-Flores, J. (2010). *Efecto de la bioacumulación de plomo sobre la tasa intrínseca de crecimiento (r) y otros parámetros poblacionales, localización celular del plomo, y determinación de factores de bioconcentración en una especie de rotífero dulceacuícola*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México.
3. American Public Health Association (APHA). 1992. Standard Methods of Water and Wastewater. 18th ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation publication. APHA, Washington D.C.
4. Anway, M.D., Leathers, C. y Skinner, M.K. (2006). Endocrine Disruptor Vinclozolin Induced Epigenetic Transgenerational Adult-Onset Disease. *Endocrinology*, 147(12), 5515–23. doi: 10.1210/en.2006-0640
5. Arias-Almeida, J.C. y Rico-Martínez, R. (2011). Inhibition of two enzyme systems in *Euchlanis dilatata* (Rotifera: Monogononta) as biomarker of effect of metals and pesticides. *Biomarkers*, 16(1), 12-19. doi: 10.3109/1354750X.2010.520336
6. Arnold, D. E. (1971). Ingestion, assimilation, survival and reproduction by *Daphnia pulex* fed seven species of blue-green algae. *Limnology & Oceanography*, 16(6), 906-920. Arzate-Cárdenas, M.A. y Martínez-Jerónimo, F. (2012). Energy resource reallocation in *Daphnia schodleri* (Anomopoda: Daphniidae) reproduction induced by exposure to hexavalent chromium. *Chemosphere*, 87(1), 326–332.
7. ATSDR (1999) *Toxicological Profile for Lead (Update)*. U.S. Dept of Health & Human Services, Atlanta, GA.
8. Aydin, R., Koprucu, K., Dorucu, M., Koprucu Simsek, S., y Pala, M.,

- (2005). Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae. *Aquacult. Int.* 13(1), 451–458.
9. Barreiro-Güemes, M.T., Meave del Castillo, M.E., Signoret-Poillon, M., y Figueroa-Torres, M.G. (2003). *Diversidad de Fitoplancton Marino. en Planctología Mexicana* (1-13). Baja California Sur, México: Sociedad Mexicana de Planctología, A.C.
 10. Bloomquist, J.R. y Miller, T.A. (1986). Neural correlates of flight activation and escape behavior in house flies recovering from pyrethroid poisoning. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 3(1), 551-559
 11. Bradford, M. M. A (1976). Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
 12. Bradley, M.C., Baird, D.J. y Callow, P. (1991). Mechanisms of energy allocation to reproduction in cladoceran *Daphnia magna* Straus. *The linnean society of London* 44(1), 325-333.
 13. Cairns Jr. J. y McCormick, P. V. (1992). Developing an ecosystem-based capability for ecological risk assessments. *Environmental profesional*, 14(1), 186–196.
 14. Chávez, F.P. (2014). Biogeochemical cycles. Monterey Bay Aquarium Research Institute. Recuperado de: <http://www3.mbari.org/bog/documents/biogeo/>
 15. CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). (2008). La Biodiversidad en Aguascalientes: Estudio de Estado. Aguascalientes, México. Instituto del Medio Ambiente del Estado de Aguascalientes (IMAE), Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA). Recuperado de: <http://www.biodiversidad.gob.mx/region/EEB/pdf/ESTUDIO%20DE%20BIODIVERSIDAD%20EN%20AGUASCALIENTES.pdf>
 16. De- Schamphelaere, K. A. C. y Janssen, C. R. (2002) A Biotic Ligand Model Predicting Acute Copper Toxicity for *Daphnia magna*: The Effects

- of Calcium, Magnesium, Sodium, Potassium, and pH. *Environ. Sci. Technol.* 36(1), 48-54.
17. Dekker, T., Krips, O.E. y Admiraal, W. (2002). Life history changes in the benthic cladoceran *Chydorus piger* induced by low concentrations of sediment-bound cadmium. *Aquatic Toxicology* 56(1), 93-101.
 18. Días-Báez, M.C., Pica-Granados, y Ronco, A. (2004). Ensayos de Toxicidad Aguda con el cladóceros *Daphnia magna*. En Castillo, G. (Ed.), *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas* (pp.202). Canadá: IDRC, IMTA.
 19. Dodson, S., Merritt, C., Shannahan, J. y Shults, C. (1999): Low exposure concentrations of atrazine increase male production in *Daphnia pulicaria*. *Environ Toxicol Chem* 18(1), 1568-1573.
 20. Dos-Santos-Silva, E., Bruno de Abreu, C. Orlando, T.C., Wisniewski, C. y Dos-Santos-Wisniewski, M.J. (2004). *Alona iheringula* Sinev & Kotov, (Crustacea, Anomopoda, Chydoridae, Aloninae): Life Cycle and DNA Barcode with Implications for the Taxonomy of the Aloninae Subfamily. *Plos One* 9(5), 1-7.
 21. Du, Y., Nomura, Y., Luo, N., Liu, Z., Lee, J.E., Khambay, B., Dong, K., (2009). Molecular determinants on the insect sodium channel for the specific action of type II pyrethroid insecticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234(1), 266-272.
 22. EC (Environment Canada), (1990) *Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to Daphnia magna*. Report EPS 1/RM/14, 18 pp.
 23. EC (Environment Canada) (1999) Canadian Sediment Quality Guidelines for Lead. National Guidelines and Standards Office, Environmental Quality Branch, Environment Canada, Ottawa.
 24. Elías-Gutierrez, M., Ciro-Pérez, J., Gutierrez-Aguirre, M., Cervantes-Martínez, A. (1997). A checklist of the littoral cladocerans from Mexico, with descriptions of five taxa recently recorded from the Neovolcanic Province. *Hydrobiologia* 360(1), 63-73

25. Elías-Gutiérrez, M., Suárez-Morales, E., Gutiérrez-Aguirre, M.A., Silva-Briano, M., Granados-Ramírez, J.G., y Garfias-Espejo, T. (2008). Cladocera. En Cladóceras y Copépodos de las aguas continentales de México (7-110). Estado de México, México: SEMARNAT.
26. Falkowski, P.G. (1994). The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis Research* 39(1), 235-258.
27. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). *México en una mirada*. (2016). Ciudad de México: FAO en México. Recuperado de: <http://www.fao.org/mexico/fao-en-mexico/mexico-en-una-mirada/es/>
28. Fleeger, J.W., Carman, K.R., y Nisbet, R.M. (2003). Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *The Science of the Total Environment* 317(1), 207-233.
29. Fowler, S.D. Y Greenspan, P. (1985). Application of Nile Red, a Fluorescent Hydrophobic Probe, for the Detection of Neutral Lipid Deposits in Tissue Sections: Comparison with Oil Red O. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 33(8), 833-836.
30. Frey, D. G., (1959). The taxonomic and phylogenetic significance of the head pores of the Chydoridae (Cladocera). *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 44(1), 27-50.
31. Frings, C. S. y Dunn, R. T. (1970). A Colorimetric Method for Determination of Total Serum Lipids Based on the Sulfo-phospho-vanillin Reaction. *American Society of Clinical Pathologists* 53(1), 89-91. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/53.1.89>
32. Fryer, G. (1993). The Freshwater Crustacea of Yorkshire: a faunistic and ecological survey. Yorkshire Naturalists' Union and Leeds Philosophical and Literary Society. Kendall: Titus Wilson and Son.
33. Gliwicz, M. Z. (1990). Food thresholds and body size in cladocerans. *Nature* 343(1), 638-640
34. Gómez-Díaz, P. (2008). *Aspectos de la biología experimental de leydigia lousi mexicana (Anomopoda: Chydoridae)*. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, México.

35. Gonzalez-Sánchez, F. y Camprubi, A. (2010). La pequeña minería en México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 62(1), 100-108.
36. Guan-Hua, H., Chen, G. Y Chen, F. (2009). Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence. *Biomass and Bioenergy* 33(1), 1386–1392. doi: 10.1016/j.biombioe.2009.05.022
37. Gupta, P.K., Khangarot, B.S. y Durve, V.S. (2001). The temperatura dependence of the acute toxicity of copper to a freshwater pond snail, *Viviparus bengalensis* L. *Hydrobiologia* 83(1), 461–464.
38. Guzmán-Colis, G., Thalasso, F., Ramírez-López, E.M., Rodríguez-Narciso, S., Guerrero-Barrera, A.L., y Avelar-González, F.J. (2011). Evaluación espacio-temporal de la calidad del agua del río San Pedro en el Estado de Aguascalientes, México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 27(2), 89-102.
39. Haeba, M.H., Hilscherová, K., Mazurová, E. y Bláha, L. (2008). Selected Endocrine Disrupting Compounds (Vinclozolin, Flutamide, Ketoconazole and Dicofof): Effects on Survival, Occurrence of Males, Growth, Molting and Reproduction of *Daphnia magna*. *Env Sci Pollut Res* 15(3) 222–227.
40. Haevel, J. E. y Medley, K.A. (2006). Biological invasions across spatial scales: intercontinental, regional, and local dispersal of cladoceran zooplankton. *Biological Invasions* 8(1), 459–473.
41. Hanazato, T. (2001). Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environ Pollut.* 112(1):1-10.
42. Hengel, M. J. y Shibamoto, T. (2000). Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Method for the Analysis of Dimethomorph Fungicide in Dried Hops. *J. Agric. Food Chem.* (2000), 48(1), 5824-5828.
43. Hernández-Antonio, A. y Hansen, A. M. (2011). PESTICIDE USE IN TWO AREAS OF MEXICO AND AGRICULTURAL assessment of pollution of water and sediment. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 27(2), 115-127, 2011
44. Hernández-Becerril, D.U. (2014). Biodiversidad de algas planctónicas marinas (Cyanobacteria, Prasinophyceae, Euglenophyta, Chrysophyceae, Dictyochophyceae, Eustigmatophyceae, Parmophyceae,

- Raphidophyceae, Bacillariophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Dinoflagellata) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85(1), 44-53.
45. Hofmann, W. (2000). Response of the chydorid faunas to rapid climatic changes in four alpine lakes at different altitudes. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 159(1), 281-292
46. INECC (Instituto Nacional De Ecología Y Cambio Climático). (2012) *Metales Pesados*. Ciudad de México: Instituto Nacional De Ecología Y Cambio Climático. Recuperado de: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/estudios/383/mpesados.html>
47. ISO 6341-1989. Water quality. Determination of inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus. The International Organization for Standardization Catalogue, Geneva, Switzerland (1989).
48. ISO 10706:2000. Water quality. Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) (2000) (En línea).
http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?cnumber=18795
49. ISO 6341:2012. Water quality. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity (2012) (En línea).
<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:6341:ed-4:v1:en>
50. ISO 8692:2012 Water quality. Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae (2012) (En línea).
http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?cnumber=54150
51. Klimek, B., Fiałkowska, E., Kocerba-Soroka, W., Fyda, J., Sobczyk, M. y Pajdak-Stoś, A. (2013). The Toxicity of Selected Trace Metals to Lecane inermis Rotifers Isolated from Activated Sludge. *Environ Contam Toxicol.* 91(1), 330-333.

52. Klütitgen, B, Dülmer, U. y Ratte, H.T. (1994). ADaM, an artificial freshwater for the culture of zooplankton. *Water research* 28(3), 743-746. doi: 10.1016/0043-1354(94)90157-0
53. Kopplin, M. (2004). The University of Arizona, Center for Toxicology: Pruebas de Toxicidad. Arizona, Estados Unidos de América: The University of Arizona. Recuperado de: <http://toxamb.pharmacy.arizona.edu/c6-3-3-2.html>
54. Korhola, A. y Rautio, M. (2001). Cladocera and other branchiopod crustaceans. *Developments in Paleoenvironmental Research* 4(1), 5-41.
55. Kotov, A.A., (2006). Adaptations of Anomopoda Crustaceans (Cladocera) to the Benthic Mode of Life. *Entomological Review* 86(2), S210-S225. Doi: 10.1134/S0013873806110157
56. Kotov, A.A. y Sinev, A.Y. (2004). Notes on Aloninae Dybowski & Grochowski, 1894 emend. Frey, 1967 (Cladocera: Anomopoda: Chydoridae): *Alona iheringula* instead of *A. iheringi* Sars, 1901, with comments on this taxon. *Arthropoda Selecta* 13(3), 95-98.
57. Langdon-Brooks, J. y Dodson, S.I. (1965). Predation, Body Size, and Composition of Plankton Science, *New Series* 150(3692), 28-35
58. Lee, J.H., y Gu, M.B. (2004). An integrated mini biosensor system for continuous water toxicity monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*. 20(2005), 1744-1749.
59. Leboulanger, C., Bouvy, M., Pagano, M., Dufor, R. A. y Got, P. (2009). Responses of planktonic microorganisms from tropical reservoirs to paraquat and deltamethrin exposure. *Arch Environ Contam Toxicol*. 56(1), 39-51. doi: 10.1007/s00244-008-9164-z
60. Lloyd, R. & Herbert, D. W. M. (1960). The influence of carbon dioxide on the toxicity of unionized ammonia to rainbow trout. *Ann. appl. Biol.* 48(1), 399-404.
61. Lopes, I., Moreira-Santos, M., Da-Silva, E. M., Sousa, J.P., Guillhermino, L., Soares, A. M. y Ribeiro, R. In situ assays with tropical cladocerans to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. *Chemosphere* 67(11), 2250-2256.

62. Mager, E.M., Brix, K.V., Gerdes, R.M., Ryan, A.C. y Grosell, M. (2011). Effects of water chemistry on the chronic toxicity of lead to the cladoceran, *Ceriodaphnia dubia*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 74(3), 238-43. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.11.005.
63. Martínez-Jerónimo F., Villaseñor, R., Rios, G. y Espinosa, F. (1994). Effect of food type and concentration on the survival, longevity, and reproduction of *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 287(1), 207-214.
64. Minami, A., Tokifumi, M. y Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical biochemistry* 339(1), 69-72.
65. Mount, D.I. y Norberg, T.J. (1984). A seven-day life cycle cladoceran toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 3(3), 425-434.
66. Muñoz-Peñuela, M., Otero-Paternina, A.M., Medina-Robles, V.M. y Cruz-Casallas, P.M. (2013). Comportamiento reproductivo de *Alona sp.* y *Diaphanosoma sp.* (Crustacea: cladocera) bajo diferentes fotoperiodos. *Rev. Lasallista de investigación* 19(2), 17-24.
67. Murugan, N. y Job, S. V. (1982). Laboratory studies on the life cycle of *Leydigia acanthocercoides* Fisher (1854) (Cladocera: Chydoridae). *Hydrobiologia* 89(9), 9-16. doi:10.1007/BF00017533
68. Nandini, S., Aguilera-Lara, D., Sarma, S.S.S., y Ramírez-García, P. (2004). The ability of selected cladoceran species to utilize domestic wastewaters in Mexico City. *Journal of Environmental Management* 71(1), 59-65.
69. Newman, M. C., (2009), *Fundamentals of Ecotoxicology*, United States of America: CRC Press
70. NMX-AA-087-SCFI-2010 Norma Mexicana Análisis de agua- Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna* straus (Crustacea-Cladocera)- Método de prueba. Diario Oficial de la Federación, Ciudad de México, México, 16 de febrero de 2011.
71. NMX-AA-110-1995-SCFI Norma Mexicana Análisis del agua- Evaluación de toxicidad aguda con *Artemia franciscana Kellogg* (crustacea -

- anostraca) - Método de prueba. Diario Oficial de la Federación, Ciudad de México, México, 12 de abril de 1996.
- 72.NOM-001-SEMARNAT-1996 Norma Oficial Mexicana Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación, Ciudad de México, México, 6 de enero de 1997.
- 73.NOM-002-ECOL-1996 Norma Oficial Mexicana Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. Diario Oficial de la Federación, Ciudad de México, México, 3 de junio de 1998.
- 74.NOM-003-SEMARNAT-1997 Norma Oficial Mexicana, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público. Diario Oficial de la Federación, Ciudad de México, México, 30 de abril de 1997.
- 75.Nuñez, M. y Hurtado, J. (2005). Acute toxicity bioassays using *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) maintained in a modified culture médium. *Rev. peru. biol.* 12(1), 165-170.
- 76.NOM-127-SSA1-1994. (2000) Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación, 22 Nov. 2000.
- 77.Nordberg, G., (1998), *Metales: Propiedades químicas y toxicidad. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. Barcelona, España, Editorial Chantal Dufrense.
- 78.Nuñez, M., y Hurtado J. (2005). Bioensayos de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. *Rev. peru. biol.* 12(1), 165-170.
- 79.OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (1984). Guideline for testing of chemicals- *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test. Document No. 202.
- 80.OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). (1996). *Guideline for Testing of Chemical, Daphnia* sp., Acute

- Immobilisation Test and Reproduction Test. Document No. 202. OECD, Paris.*
81. Olguín, H.F., Puig, A., Loez, C.R. et al. (2004). An Integration of Water Physicochemistry, Algal Bioassays, Phytoplankton, and Zooplankton for Ecotoxicological Assessment in a Highly Polluted Lowland River. *Water, Air, and Soil Pollution* 155(1), 355-381. doi:10.1023/B:WATE.0000026538.51477.c2
 82. Oliveros, O. B. (1980). Campaña limnológica "Keratella I" en el Río Paraná Medio: Aspectos tróficos de peces de ambientes leníticos. *Ecología* 4(1), 115-126.
 83. Ongley, E.D. (1996). Control of water pollution from agriculture. *Irrigation and Drainage Paper* 55(1), 111
 84. Pakrashi, S., Dalai, S., Humayun, A., Chakravarty, S., Chandrasekaran, N y Mukherjee, A. (2013). *Ceriodaphnia dubia* as a Potential Bio-Indicator for Assessing Acute Aluminum Oxide Nanoparticle Toxicity in Fresh Water Environment. *PLoS One* 8(9), e74003. doi: 10.1371/journal.pone.0074003
 85. Papadopoulou-Marukidou, E. (1991) Postharvest-applied agrochemicals and their residues in fresh fruits and vegetables. *J Assoc Off Anal Chem* 74(1), 745-765.
 86. Pawlisz, J., Busnarda, J., McLaughlin, A., Caux, P.Y., Kent, R.A., (1998). Canadian waterquality guidelines for deltamethrin. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13(1), 175-210.
 87. Pawlisz, J., Busnarda, J., McLaughlin, A., Caux, P.Y. y Kent, R.A. (1998). Canadian waterquality guidelines for deltamethrin. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13(1), 175-210.
 88. Rand, G. M. (Ed.). (1995). *Fundamentals Of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate And Risk Assessment.* Palm beach Florida, USA: Ecological Services Inc.
 89. Rico-Martínez, R. (2008). Ecotoxicología Acuática. En Jaramillo-Juárez, F. Rincón-Sánchez, A.R., y Rico-Martínez, R. *Toxicología Ambiental* (pp. 175-177). Aguascalientes, México: Textos Universitarios.

90. Rojas de Arias A, Lehane, M.J., Schofield, C.J. y Maldonado, M. (2004). Pyrethroid insecticide evaluation on different house structures in a Chagas disease endemic area of the Paraguayan Chaco. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(1) 657-662. doi: 10.1590/S0074-02762004000600022
91. Sacherová, V. y Hebert, P.D. (2003). The evolutionary history of the Chydoridae (Crustacea: Cladocera). *Biological Journal of the Linnean Society* 79(1), 629–643.
92. Santos, R.M., Negreiros, N.F., Silva, L.C., Rocha, O. y Santos-Wisniewski, MJ. (2010). Biomass and production of Cladocera in Furnas Reservoir, Minas Gerais, Brazil. *Braz. J. Biol.* 70(3), 879-887.
93. Santos-Wisniewski, M.J., Rocha, O., Guntzel, A.M., Matsumura-Tundisi, T. (2006) Aspects of the Life Cycle of Chydorus pubescens Sars, 1901 (Cladocera:Chydoridae). *Acta Limnologica Brasiliensia* 18(3), 305–310.
94. SEDESOL/INE (1993) México. Informe de la Situación General en Materia de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente 1991–1992. Secretaría de Desarrollo Social, México DF, p 137.
95. SEDESOL/INE (1994) México. Informe de la Situación General en Materia de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente, 1993–1994. Secretaría de Desarrollo Social, México DF, p 166.
96. SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). (2009). Metales Pesados. Ciudad de México, México: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. Recuperado de: <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/763-agre-metales>
97. SENER (2007). Anuario estadístico de la industria petroquímica. Secretaría de Energía. México, D.F. 289 pp.
98. Sharma, S. y Sharma, B.K. (1998). Observations on the longevity, instar durations, fecundity and growth in Alonella excisa (Fisher) (Cladocera, Chydoridae). *Indian Journal of Animal Sciences* 68(1), 101–104.
99. Shen, M. F., Kumar, A., Ding, S. Y. Y Grocke, S. (2012). Comparative study on the toxicity of pyrethroids, a-cypermethrin and deltamethrin to *Ceriodaphnia dubia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78(1), 9–13

100. Sinev, A.Y. (1999) *Alona costata* Sars, 1862 versus related palaeotropical species: the first example of close relations between species with a different number of main head pores among Chydoridae (Crustacea: Anomopoda). *Arthropoda Selecta* 8(3), 131–148.
101. Sinev, Y. A. (2002). Place of Central American bromeliad-inhabiting cladoceran *Alona bromelicola* Smirnov, 1988 within the genus (Branchiopoda: Anomopoda: Chydoridae). *Arthropoda Selecta* 11(2), 109-116.
102. Sinev, A.Y., y Kotov, A.A. (2000). Redescription of *Alona labrosa* Vasiljeva & Smirnov, 1969 (Chydoridae, Anomopoda, Branchiopoda) *Hydrobiologia* 439(1), 125–139.
103. Sinev, A. y Silva-Briano, M. (2012). Cladocerans of genus *Alona* Baird, 1843 (Cladocera: Anomopoda: Chydoridae) and related genera from Aguascalientes State, Mexico. *Zootaxa* 3569(1), 1–24.
104. Spencer, E.Y. (1964). Guide to the chemical used in crop protection. *J Chem Soc* 4(1), 228–229.
105. Tidou, A. S., Moreteau, J. C. Y Ramade, F. (1992) Effects of lindane and deltamethrin on zooplankton communities of experimental ponds *Hydrobiologia* 232 (1), 157-168.
106. Tingaud-Sequeira, A., et al., (2011). Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. *Journal of Lipid Research* 52(1), 1765-1772.
107. Toumi, H., Boumaiza, M., Immel, F., Sohom, B., Felten, V. y Féraud, J.F. (2014). Effect of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on two clones of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera): A proteomic investigation. *Aquatic Toxicology* 148 (1), 40– 47.
108. Toumi, H., Boumaiza, M., Millet, M., Radetski, C.M., Felten, V. y Féraud, J.F. (2015). Is acetylcholinesterase a biomarker of susceptibility in *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) after deltamethrin exposure? *Chemosphere* 120(1), 351–356.
109. Tremel, B., Frey, S.E., Yan, N.D., Somers, K.M. (2000). Habitat specificity of littoral Chydoridae (Crustacea, Branchiopoda, Anomopoda)

in Plastic Lake, Ontario, Canada. *Hydrobiologia* 432(1), 195–205.

110. Ubillo-Limus, J. (2003). Características del Plomo. Lima, Perú: Biblioteca Central de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado de:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/ingenie/ubillus_lj/cap2.pdf
111. USEPA (2000a) Reregistration eligibility decision for vinclozolin. Prevention, pesticides and toxic substances. United States Environmental Protection Agency
<http://www.epa.gov/opp00001/reregistration/REDs/2740red.pdf>
112. USEPA (2000b) *Federal Water Quality Standards Requirements. Water quality standards regulation*. U.S. Government Publishing Office. United States Environmental Protection Agency Federal Regulation 40 CFR 131 (En línea) <https://www.epa.gov/wqs-tech/federal-water-quality-standards-requirements#federal1>
113. USEPA (2002a) . Clean Water Act Analytical Methods. Freshwater and Marine Organisms. Chronic Toxicity to Freshwater Organisms. U.S. Government Publishing Office. United States Environmental Protection Agency Federal Regulation 40 CFR 136.3 (En línea). <https://www.epa.gov/cwa-methods/chronic-toxicity-freshwater-wet-methods>
114. USEPA (2002b) . Clean Water Act Analytical Methods. Freshwater and Marine Organisms. Acute Toxicity to Freshwater Organisms. U.S. Government Publishing Office. United States Environmental Protection Agency Federal Regulation 40 CFR 136.3 (En línea). <https://www.epa.gov/cwa-methods/acute-toxicity-wet-methods>
115. USEPA (2002c) Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Method 2012.0. United States Environmental Protection Agency. EPA-821-R-02-012. (En línea). <https://www.epa.gov/cwa-methods/whole-effluent-toxicity-methods>

116. USEPA (2002d) Method 1002.0: Daphnid, *Ceriodaphnia dubia*, Survival and Reproduction Test; Chronic Toxicity EPA-821-R-02-013
117. USEPA (2003) *Vinclozolin: notice of filing a pesticide petition to establish a tolerance for a certain pesticide chemical in or on food*, Federal Register. United States Environmental Protection Agency (En línea) <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2003-03-26/pdf/03-7246.pdf>
- 118.
119. USEPA (2010). *Types of Pesticides*. United States Environmental Protection Agency [en línea]. <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.html>
120. USEPA (2015). Capítulo 15: Fungicidas. (En línea). Inglés. Revisado el 27 de mayo de 2015. United States Environmental Protection Agency. Disponible en: <http://www.epa.gov/oppfead1/safety/spanish/healthcare/handbook/Spch15.pdf>
121. Uzumcu, M., Suzuki, H. y Skinner, M.K. (2004). Effect of the anti-androgenic endocrine disruptor vinclozolin on embryonic testis cord formation and postnatal testis development and function. *Reprod. Toxicol.* 18(6), 765-74.
122. Velandia-guauque, L.M. (2010). *Determinación de la concentración letal media (cl50-48) del plomo y cromo hexavalente mediante bioensayos de toxicidad acuática utilizando *Daphnia pulex**. (Tesis de Grado para Optar al Título de Ingenieras Ambientales y Sanitarias). Universidad de la Salle. Bogotá, D.C.
123. Von Der Ohe, P.C. y Liess, M. (2004). Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds. *Environ.Toxicol.Chem.*23(1), 150-156.
124. WHO (World Health Organization) (1995). *Environmental Health Criteria 165: Inorganic Lead, International Programme on Chemical Safety*. Geneva, World Health Organization.
125. Wolman A. (1968, 1º de octubre). Pollution as an International Issue. Foreign affairs magazine. Recuperado de:

<https://www.foreignaffairs.com/articles/1968-10-01/pollution-international-issue>

126. Yilmaz, M., Gul, A. y Erbasli, K. (2004). Acute toxicity of alpha-cypermethrin to guppy (*Poecilia reticulata*, Pallas, 1859). *Chemosphere* 56(1), 381–385.



14. ANEXO

ANEXO A

BIOMARCADORES: CONTENIDO CALÓRICO DE MARCOMOLÉCULAS POR ORGANISMO

		Proteínas $\mu\text{cal/org}$				
DELTAMETRINA	CONTROL (-)	14.44	15.12	16.73	15.37	
	1/80	11.95	12.49	12.34	11.81	
	1/40	9.76	9.56	10.34	10.10	
	1/20	4.20	4.44	4.74	4.00	
	1 / 10	2.59	2.74	2.54	2.88	
	1/5	2.25	2.49	2.05	1.96	
PLOMO	CONTROL (-)	15.61	15.51	15.90	15.76	
	1/80	12.00	13.03	12.83	12.24	
	1/40	11.76	12.24	12.20	11.66	
	1/20	11.27	10.93	11.22	10.64	
	1/10	4.10	3.47	4.05	4.69	
	1/5	2.39	2.25	2.78	3.03	
		Carbohidratos $\mu\text{cal/org}$				
DELTAMETRINA	CONTROL (-)	3.52	3.38	4.03	3.36	
	1/80	3.31	3.58	3.15	3.44	
	1/40	2.89	2.50	3.15	2.32	
	1/20	2.28	1.99	2.25	2.15	
	1 / 10	1.93	2.15	1.76	1.58	
	1/5	0.85	0.58	0.36	1.13	
PLOMO	CONTROL (-)	3.85	3.62	3.95	3.48	
	1/80	2.85	3.09	3.19	3.09	
	1/40	2.68	2.99	2.83	2.54	
	1/20	2.62	2.40	2.58	2.72	
	1/10	2.13	1.99	2.25	2.075	
	1/5	0.58	0.44	0.64	0.54	

Lípidos $\mu\text{cal/org}$					
DELTAMETRINA	CONTROL (-)	7.34	7.43	7.12	7.61
	1/80	6.67	6.58	6.04	6.31
	1/40	5.60	4.92	5.42	5.28
	1/20	2.73	2.95	3.31	3.13
	1 /10	2.28	2.51	2.60	2.01
	1/5	2.28	2.51	2.60	2.01

PLOMO	CONTROL (-)	7.66	7.12	7.92	7.39
	1/80	7.43	6.94	7.21	6.98
	1/40	6.63	6.22	6.67	6.54
	1/20	6.09	5.82	5.60	5.42
	1/10	4.12	4.48	4.30	4.61
	1/5	2.64	3.09	2.46	3.45

Calorías $\mu\text{cal/org}$					
DELTAMETRINA	CONTROL (-)	25.31	25.94	27.89	26.34
	1/80	21.95	22.66	21.55	21.57
	1/40	18.25	17.00	18.92	17.71
	1/20	9.15	9.40	10.31	9.30
	1 /10	6.81	7.40	6.91	6.49
	1/5	5.39	5.59	5.02	5.11

PLOMO	CONTROL (-)	27.12	26.26	27.78	26.63
	1/80	22.29	23.06	23.24	22.25
	1/40	21.08	21.47	21.70	20.75
	1/20	19.99	19.15	19.41	18.79
	1/10	10.36	9.94	10.61	11.38
	1/5	5.63	5.78	5.90	7.02