



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

Doctorado en Ciencias Biológicas

Centro de Ciencias Básicas

Departamento de Química

TESIS:

Estudio de la Toxicidad Aguda y Crónica de cinco metales (Cu, Fe,  
Hg, Ni y Zn) en cuatro especies planctónicas.

PRESENTA:

M. en C. Saraí Hernández Flores

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas (Toxicología)

Tutor

Dr. Roberto Rico Martínez

Asesores

Dra. Elsa Marcela Ramírez López

Dr. Marcelo Silva Briano.

Aguascalientes, Ags., Diciembre de 2020.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

Departamento de Química

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Decano del Centro de Ciencias Básicas

PRESENTE

Por este conducto, el comité de titulación de la alumna M. en C. Saraí Hernández Flores (ID 11054) da el visto bueno a la tesis titulada: "Estudio de la toxicidad aguda y crónica de cinco metales (Cu, Fe, Hg, Ni y Zn) en cuatro especies planctónicas". Esta tesis he sido desarrollada en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Esta tesis forma parte de los requisitos de graduación de Saraí quien ya cuenta con un artículo publicado en revista indizada y puede así continuar con sus trámites de titulación.

Sin otro asunto que tratar no nos me resta sino enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags, a 20 de noviembre del 2020

Vo. Bo.

Dr. Roberto Rico Martínez

Director de tesis de Saraí

Dra. Elsa Marcela Ramírez López

Asesora

Dr. Marcelo Silva Briano

Asesor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN  
DE GRADO**



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 03-sep-20

**NOMBRE:** SARAI HERNANDEZ FLORES **ID** 11054

**PROGRAMA:** DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS **LGAC (del posgrado):** Toxicología y bioingeniería ambiental

**TIPO DE TRABAJO:** (  ) Tesis ( ) Trabajo práctico

**TITULO:** Estudio de la Toxicidad Aguda y Crónica de cinco metales (Cu, Fe, Hg, Ni y Zn) en cuatro especies planctónicas.

**IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):**

Los resultados obtenidos sirven para realizar monitoreo toxicológico de cuerpos de agua

**INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:**

*Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:*

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- NA Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

*El egresado cumple con lo siguiente:*

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- NA Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- SI Coincide con el título y objetivo registrado
- SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
- SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

*En caso de Tesis por artículos científicos publicados:*

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- SI El estudiante es el primer autor
- SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

**Sí**  **No**

**FIRMAS**

**Elaboró:**

\* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

\* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

**Revisó:**

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DRA. HAYDÉE MARTÍNEZ RUVALCABA

**Autorizó:**

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFEREZ CHÁVEZ

**Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado**

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: .... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.



# Evaluation of bioconcentration and toxicity of five metals in the freshwater rotifer *Euchlanis dilatata* Ehrenberg, 1832

Saraí Hernández-Flores<sup>1</sup> · Gustavo Emilio Santos-Medrano<sup>1</sup> · Isidoro Rubio-Franchini<sup>2</sup> · Roberto Rico-Martínez<sup>1</sup> 

Received: 1 November 2019 / Accepted: 31 January 2020  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

## Abstract

Metals are widely used in modern society harming the environment; their toxicity cause environmental adverse effects to many organisms including zooplankton. This contribution employed: (a) acute and chronic toxicity tests, (b) epifluorescence image analysis, and (c) atomic absorption techniques, to analyze toxicity of four trace (copper, iron, nickel, and zinc), and one non-trace metals (mercury) on the freshwater rotifer *Euchlanis dilatata*. This work integrated results of Bioconcentration Factors (BCF's), sites of entry and accumulation and to determine mechanisms of uptake and toxicity of these five metals of the freshwater rotifer *Euchlanis dilatata*. This integral analysis enhanced our understanding of knowledge on: (a) the toxicity mechanisms, (b) sites of metal entry and concentration inside the rotifer, (c) bioconcentration and body burdens. As expected, Hg the non-trace metal used here, was the most toxic. Our results suggest that the toxicity is ameliorated in the rotifer by selecting feeding avoiding the most toxic particles and reducing adverse effects on reproduction, until mortality per se reduces reproduction. The chronic effect on ingestion rate was quite sensitive for all metals whereas reproduction was slightly affected. The combination of acute and chronic tests and determination of BCF's for each metal allowed calculation of the acute and chronic body burdens. Body burdens again confirmed that mercury was the most toxic metal of the five employed here.

**Keywords** Bioconcentration factors · Metal toxicity · Body burdens · Environmental toxicology · Non-trace metal · Trace metals · Zooplankton · Aquatic toxicology

## Introduction

Metals are widely used in modern society, and as a consequence they harm the environment and their toxicity cause ecological, evolutionary, nutritional, and environmental adverse effects (Boyd 2010; Jaishankar et al. 2014). These problems are caused because metals are persistent, not

biodegradable and can be bioconcentrated and biomagnified by entering trophic chains, including human ones (Mohammad et al. 2011; Hazrat and Ezzat 2018). In aquatic systems, metals are released from natural sources (volcanic eruptions) and human activities such as industry and agriculture which are the main source of metal contamination (Zhou et al. 2008; Hazrat and Ezzat 2018).

Metals dissolve easily in water and are taken by aquatic invertebrates, their assimilation be subject to: (a) food, (b) behavior, (c) life cycle, (d) body size of the organism, and (e) duration of exposure. For example, in some predatory arthropods, metals are captured predominantly with food, while in the filters feeders metals come from water (Golovanova 2008; Gheorghe et al. 2017). In small concentrations, some metals are essential for organisms (Cu, Fe, Mn, Ni, Zn), maintaining biochemical and physiological functions. However, when they reach high concentrations cause adverse effects on growth, metabolism or reproduction. Otherwise, there are non-essential metals (Cd, Pb, Hg) which do not have a known biological role and are toxic to organisms at very low concentrations (Alarcón-Corredor 2009). The toxicity of metals on

Responsible Editor: Philippe Garrigues

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11356-020-07958-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Roberto Rico-Martínez  
rrico@correo.uaa.mx

<sup>1</sup> Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Química, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Avenida Universidad 940, C.P. 20100 Aguascalientes, Ags, Mexico

<sup>2</sup> Instituto de Salud del Estado de Aguascalientes. Laboratorio Estatal de Salud Pública, Av Siglo XXI 105, Morelos, Desarrollo Especial Centro de Morelos, 20270 Aguascalientes, Ags, Mexico

## **Agradecimientos**

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado en sus instalaciones y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca para realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco a mi tutor el Dr. Roberto Rico Martínez por su dirección, paciencia y apoyo en el desarrollo de esta tesis.

Agradezco la Dra. Elsa Marcela Ramírez López por su apoyo, asesorías y comentarios

Agradezco a mi tutor Dr. Marcelo Silva Briano por su asesoría y apoyo.

Agradezco al Dr. Isidoro Rubio Franchini por su apoyo técnico en la determinación de las concentraciones reales y bioconcentración de los metales.

Agradezco al Dr. Gustavo Santos Medrano por su apoyo, y asesoría en el trabajo de laboratorio, así como al Dr. Daniel Robles Vargas.

*Dedicada con profundo amor*

*A mi hijo Emmanuel y a mi compañero de vida Gustavo*

*A mis padres Miguel† y Yolanda*

*A mis abuelitos Manuel† y Paquita*

*A mi tía Lili.*

*Siempre han sido mi inspiración, apoyo y fortaleza.*

## Índice General

Resumen .....	8
Abstract .....	9
<b>1. Introducción</b> .....	10
<b>2. Marco Teórico</b> .....	12
<b>2.1 Pruebas de toxicidad</b> .....	12
<b>2.2 Organismos de Prueba</b> .....	15
2.2.1 Microalgas .....	15
2.2.2 Ciliados .....	17
2.2.3 Rotíferos .....	18
2.2.4 Cladóceros .....	20
<b>2.3. Metales</b> .....	21
2.3.1 Cobre .....	25
2.3.2 Hierro .....	26
2.3.3 Mercurio .....	28
2.3.4 Níquel .....	29
2.3.5 Zinc .....	30
<b>2.4 Rutas de Ingreso de los metales</b> .....	32
<b>3. Justificación</b> .....	33
<b>4. Hipótesis</b> .....	34
<b>5. Objetivo General</b> .....	34
<b>5.1 Objetivos Particulares</b> .....	34
<b>6. Materiales y Métodos</b> .....	36
<b>6.1. Cultivo de Organismos Prueba</b> .....	36
<b>6.2 Pruebas de Toxicidad aguda</b> .....	36
6.2.1 Prueba aguda con <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	37
6.2.2 Prueba aguda con <i>Euchlanis dilatata</i> .....	37
6.2.3 Prueba de aguda con <i>Paramecium caudatum</i> .....	38

6.2.4 Prueba aguda con <i>Moina macrocopa</i> .....	38
6.2.5 Media Geométrica .....	39
<b>6.3 Pruebas de Toxicidad Crónica</b> .....	39
6.3.1 Prueba crónica con <i>Nannochloropsis oculata</i> . Inhibición del crecimiento .....	39
6.3.2 Prueba Crónica con <i>Euchlanis dilatata</i> . "r" Tasa Intrínseca de Crecimiento .....	39
6.3.3 Prueba Crónica con <i>Paramecium caudatum</i> . Inhibición del crecimiento .....	40
6.3.4 Prueba Crónica <i>Moina macrocopa</i> ("r") Tasa intrínseca de crecimiento .....	41
6.3.5 Prueba Crónica <i>Euchlanis dilatata</i> Inhibición de la ingestión .....	41
6.3.6 Prueba Crónica <i>Paramecium caudatum</i> Inhibición de Formación de vacuolas .....	42
<b>6.4 ACR</b> .....	43
<b>6.5 Determinación de la Biomasa.</b> .....	43
6.6.1 <i>Euchlanis dilatata</i> .....	44
6.6.2 <i>Paramecium caudatum</i> .....	44
<b>6.7 Bioconcentración</b> .....	45
6.7.1 <i>Euchlanis dilatata</i> .....	45
6.7.2 <i>Paramecium caudatum</i> .....	45
<b>6.8 Distribución de sensibilidad de especies (DSE)</b> .....	46
<b>6.9 Determinación de concentraciones reales</b> .....	46
<b>6.10 Análisis Estadístico</b> .....	46
<b>7. Resultados</b> .....	47
<b>7.1 Pruebas con <i>Nannochloropsis oculata</i></b> .....	47
<b>7.1.1 Pruebas Agudas <i>Nannochloropsis oculata</i></b> .....	47
7.1.2 Pruebas Crónicas <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	47
<b>7.2 Pruebas con <i>Euchlanis dilatata</i></b> .....	48
7.2.1 Pruebas Agudas <i>Euchlanis dilatata</i> .....	48
7.2.2 Pruebas Crónicas <i>Euchlanis dilatata</i> .....	52
<b>7.3 Pruebas con <i>Paramecium caudatum</i></b> .....	56
7.3.1 Pruebas Agudas <i>Paramecium caudatum</i> .....	56
7.3.2 Pruebas Crónicas <i>Paramecium caudatum</i> .....	56
<b>7.4 Pruebas con <i>Moina macrocopa</i></b> .....	61
7.4.1 Pruebas Agudas <i>Moina macrocopa</i> .....	61
7.4.2 Pruebas Crónicas <i>Moina macrocopa</i> .....	62

<b>7.5 Comparación de valores CL50</b> .....	65
<b>7.6 Media Geométrica</b> .....	65
<b>7.7 Bioconcentración</b> .....	67
7.7.1 <i>Euchlanis dilatata</i> .....	67
7.7.2 <i>Paramecium caudatum</i> .....	68
<b>7.8 Phen Green</b> .....	70
7.8.1 <i>Euchlanis dilatata</i> .....	70
7.8.2 <i>Paramecium caudatum</i> .....	73
<b>7.9. Distribución de sensibilidad de especies (DSE)</b> .....	76
<b>8. Discusión</b> .....	83
<b>8.1 <i>Nannochloropsis oculata</i></b> .....	83
<b>8.2 <i>Euchlanis. dilatata</i></b> .....	84
<b>8.3 <i>Paramecium caudatum</i></b> .....	89
<b>8.4 <i>Moina macrocopa</i></b> .....	92
<b>8.5 Distribución de Sensibilidad de Especies (DSE)</b> .....	94
<b>9. Conclusión</b> .....	96
<b>10. Referencias</b> .....	98

## Índice de Cuadros

Cuadro 1. Límites máximos recomendados en agua para los metales Cu, Fe, Hg, Ni y Zn.	24
Cuadro 2. Resultados de las pruebas agudas y crónicas con <i>Nannochloropsis oculata</i> .	48
Cuadro 3. Resultados para las pruebas aguda y crónicas con <i>Euchlanis dilatata</i> .	52
Cuadro 4. Resultados para las pruebas agudas y crónicas con <i>Paramecium caudatum</i> .	57
Cuadro 5. Resultados de las pruebas agudas y crónicas con <i>Moina macrocopa</i> .	62
Cuadro 6. Factor de Bioconcentración (FBC), Carga Corporal Letal (CCL), Carga Corporal Crónica ( $CCC_{Ing}$ = Inhibición de la ingestión, $CCR_{r}$ = Tasa Intrínseca de Crecimiento, y Concentración de metal acumulado en <i>Euchlanis dilatata</i> correspondiente a la CMOE aguda de cada metal después de 24 h de exposición. $ACR_{Ing}$ = Inhibición de la Ingestión, $ACR_{r}$ = Tasa Intrínseca de Crecimiento. PS = Peso Seco (media $\pm$ 1 DE, n= 5). Para todos los valores (media $\pm$ 1 DE, n= 3).	69
Cuadro 7. Factor de Bioconcentración (FBC), Carga Corporal Letal (CCL), Carga Corporal Crónica ( $CCC_{IFV}$ = Inhibición de la formación de vacuolas, $CCC_{\%IC}$ = Tasa Inhibición del crecimiento, y Concentración de metal acumulado en <i>Paramecium caudatum</i> correspondiente a la CMOE aguda de cada metal después de 24 h de exposición. $ACR_{IFV}$ = Inhibición de la formación de vacuolas, $ACR_{\%IC}$ = Inhibición del crecimiento. PS = Peso Seco (media $\pm$ 1 DE, n= 5). Para todos los valores (media $\pm$ 1 DE, n= 3).	69
Cuadro 8. Distribución de Sensibilidad de Especies. Datos Agudos y Crónicos.	82
Cuadro 9. Concentración de metal en diferentes especies.	88

**Índice de Figuras**

Figura 1. Presencia Cu, Fe, Hg, Ni y Zn reportados en diversos cuerpos de agua alrededor del mundo. .... 23

Figura 2. Presencia de Cu, Fe, Hg, Ni y Zn en agua en México. .... 24

Figura 3. Pruebas Agudas de *Nannochloropsis oculata*. Gráficas de regresión lineal entre % de Inhibición del Crecimiento de *Nannochloropsis oculata* y la concentración del metal. . 49

Figura 4. Pruebas Crónicas de Inhibición del Crecimiento de *Nannochloropsis oculata*. Gráficas de regresión lineal entre % de Inhibición de Crecimiento de *Nannochloropsis oculata* y la concentración del metal. .... 50

Figura 5. Pruebas Agudas de *Euchlanis dilatata*. Gráficas de regresión lineal entre la mortalidad en Unidades Probit de *Euchlanis dilatata* y el Log de la concentración del metal. .... 51

Figura 7. Pruebas Crónicas de Inhibición de la Ingestión. Gráficas de regresión lineal entre la Inhibición de la Ingestión de *Euchlanis dilatata* y la concentración del metal ..... 54

Figura 8. Prueba de Inhibición de la Ingestión con *Euchlanis dilatata*. La flecha muestra las microesferas fluorescentes en el intestino del rotífero. .... 55

Figura 9. Pruebas Agudas de *Paramecium caudatum*. Gráficas de regresión lineal entre la mortalidad en Unidades Probit de *Paramecium caudatum* y el Log de la concentración del metal. .... 58

Figura 10. Pruebas Crónicas de Inhibición del Crecimiento. Gráficas de regresión lineal entre el % de Inhibición del Crecimiento de *Paramecium caudatum* y la concentración del metal. .... 59

Figura 11. Pruebas Crónicas de Inhibición de la Formación de Vacuolas. Gráficas de regresión lineal entre la Inhibición de la formación de vacuolas *Paramecium caudatum* y la concentración del metal. .... 60

Figura 12. Prueba de Inhibición de Vacuolas con *Paramecium caudatum* ..... 61

Figura 13. Pruebas Agudas de *Moina macrocopa*. Gráficas de regresión lineal entre la mortalidad en Unidades Probit de *Moina Macrocopa* y el Log de la concentración del metal. .... 63

Figura 14. Pruebas Crónicas de medición de la tasa Intrínseca de Crecimiento (“r”). Gráficas de regresión lineal entre “r” de *Moina macrocopa* y la concentración del metal. .... 64

Figura 15. Gráficas con la comparación de las CL50 de cada metal con los cuatro organismos prueba..... 66

Figura 16. Gráfica de comparación de valores obtenidos de la media geométrica de los metales Cu, Hg, Fe, Ni y Zn para las cuatro especies de organismos planctónicos. .... 67

Figura 17. Comparación entre las medias de las unidades de fluorescencia obtenidas en los dos tratamientos con el colorante Phen Green en *Euchlanis dilatata*.....68

Figura 18. Control negativo de *Euchlanis dilatata* expuesto 15 min a PG ..... 72

Figura 19. Comparación entre las medias de las unidades de fluorescencia obtenidas en los dos tratamientos con el colorante Phen Green en *Paramecium caudatum* (30 min y 1 h de exposición a los metales),..... 74

Figura 20. Control negativo de *Paramecium caudatum* expuesto 15 min a PG..... 75

Figura 21. Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos agudos (CL50  $\mu\text{g/L}$ ) para Cu..... 77

Figura 22. Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos crónicos (CE50  $\mu\text{g/L}$ ) para Cu. .... 77

Figura 24. Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos crónicos (CE50  $\mu\text{g/L}$ ) para Fe. .... 78

Figura 25. Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos agudos (CL50  $\mu\text{g/L}$ ) para Hg..... 79

Figura 27. Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos agudos (CL50  $\mu\text{g/L}$ ) para Ni..... 80

Figura 28. Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos crónicos (CE50  $\mu\text{g/L}$ ) para Ni ..... 80

Figura 29. Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos agudos (CL50  $\mu\text{g/L}$ ) para Zn ..... 81

Figura 30. Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos crónicos (CE50  $\mu\text{g/L}$ ) para Zn..... 81



## Resumen

Los metales se utilizan ampliamente en la sociedad moderna y dañan el medio ambiente; su toxicidad causa efectos adversos a muchos organismos, incluido el plancton. Se realizaron: a) pruebas de toxicidad aguda y crónica, b) análisis de distribución de sensibilidad de especies, en el alga *Nannochloropsis oculata*, el rotífero *Euchlanis dilatata*, el ciliado *Paramecium caudatum* y el cladócero *Moina macrocopa*, c) análisis de imágenes de fluorescencia y c) determinación de concentraciones reales y bioconcentración de cobre, hierro, níquel y zinc y mercurio en *Euchlanis dilatata* y *Paramecium caudatum*. El Hg, fue el metal más tóxico para los cuatro organismos, seguido de Cu. Los resultados de factor de bioconcentración mostró que en el rotífero el metal que más se acumuló fue Cu (1987.5) y en el ciliado fue Hg (31900). En *Euchlanis dilatata* el principal órgano de acumulación es el estómago, en *Paramecium caudatum* se forman vacuolas que acumulan el metal. Las cargas corporales letales y crónicas confirmaron que Cu y Hg son los metales más tóxicos, para *Euchlanis dilatata* (Cu CCL = 7.35 µg/g, CCC = 0.31 µg/g, Hg CCL = 3.76 µg/g, CCC = 0.065 µg/g) y *Paramecium caudatum* (Cu CCL = 182.3 µg/g, CCC = 73.5 µg/g, Hg CCL = 178.6 µg/g, CCC = 121.2 µg/g). Los resultados del análisis de distribución de la sensibilidad de especies mostraron que *Nannochloropsis oculata* es muy tolerante a los metales y que *Euchlanis dilatata* es un organismo muy sensible por lo que puede considerarse como un buen organismo de prueba en bioensayos de toxicidad debido a sus características biológicas, su relevancia ecológica y su gran sensibilidad a los metales.

Palabras clave: Bioconcentración, Carga corporal, Phen Green, Fluorescencia, Determinación de Sensibilidad de Especies.

## Abstract

Metals are widely used in modern society and harm the environment; its toxicity causes adverse effects to many organisms, including plankton. In this research were carried out: a) acute and chronic toxicity tests, b) species sensitivity distribution analysis, in the algae *Nannochloropsis oculata*, the rotifer *Euchlanis dilatata*, the ciliate *Paramecium caudatum*, and the cladoceran *Moina macrocopa*, c) fluorescence image analysis, and c) determination of actual concentrations and bioconcentration of copper, iron, nickel and zinc and mercury in *Euchlanis dilatata* and *Paramecium caudatum*. Mercury was the most toxic metal for the four organisms, followed by Cu. The bioconcentration factor results showed that in the rotifer the metal that most accumulated was Cu (1987.5) and in the ciliated it was Hg (31900). In *Euchlanis dilatata* the main organ of accumulation is the stomach, in *Paramecium caudatum* vacuoles are formed that accumulate the metal. Lethal and chronic body burdens established that Cu and Hg are the most toxic metals, for *Euchlanis dilatata* (Cu LBB = 7.35  $\mu\text{g/g}$ , CBB = 0.31  $\mu\text{g/g}$ , Hg LBB = 3.76  $\mu\text{g/g}$ , CBB = 0.065  $\mu\text{g/g}$ ) and *Paramecium caudatum* (Cu LBB = 182.3  $\mu\text{g/g}$ , CBB = 73.5  $\mu\text{g/g}$ , Hg LBB = 178.6  $\mu\text{g/g}$ , CBB = 121.2  $\mu\text{g/g}$ ). The results of the species sensitivity distribution analysis showed that *Nannochloropsis oculata* is less sensitive to metals and that *Euchlanis dilatata* is the most sensitive organism so it can be considered as a good test organism in toxicity bioassays due to its biological characteristics, its ecological relevance, and its great sensitivity to metals.

Keywords: Bioconcentration, Body Burden, Phen Green, Fluorescence, Species Sensitivity Determination.

## 1. Introducción

El agua es un recurso esencial para la vida en el planeta, el hombre depende de su disponibilidad para todas sus actividades, tanto domésticas, agrícolas e industriales (SEMARNAT, 2013). En las últimas décadas el crecimiento demográfico acelerado y el incremento de las actividades antropogénicas han provocado un abuso en el uso del agua, siendo en algunas partes del mundo un problema el suministro de agua para consumo humano (Sierra, 2011). Otro problema relacionado con la utilización del agua es su grado de contaminación, los cuerpos superficiales y subterráneos se contaminan por las descargas de aguas municipales e industriales sin tratamiento previo, así como por los arrastres que provienen de las zonas que practican actividades agrícolas y pecuarias (SEMARNAT, 2013).

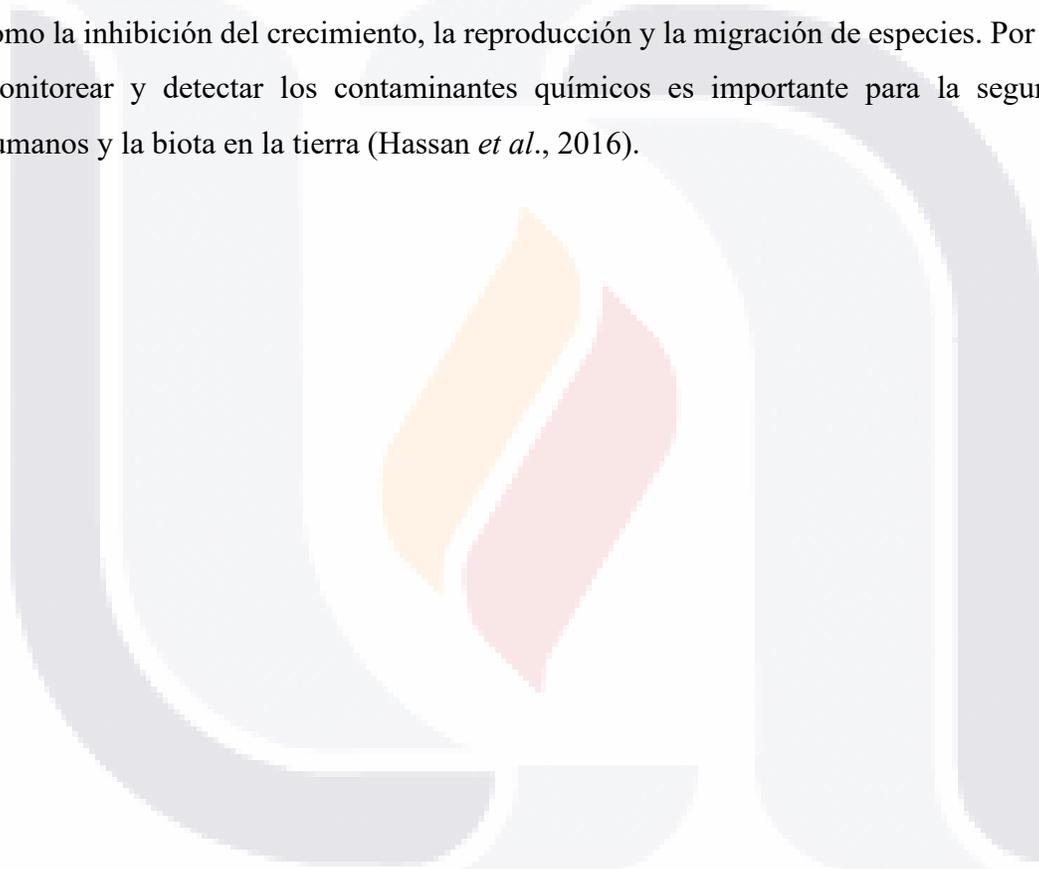
La problemática del agua se ha centrado principalmente en las necesidades humanas, los cuerpos de agua naturales han sido contaminados gradualmente y fueron las causantes de muchas epidemias en la antigüedad; tuvo que pasar mucho tiempo para que el hombre se diera cuenta de que el agua que estaba consumiendo era la causante de muchas de las enfermedades que lo afectaban y hasta el siglo XVIII y principios del siglo XIX empezó a implementar procesos para tratar y desinfectar el agua que consumía. También es importante destacar su importancia como parte esencial en el funcionamiento del medioambiente acuático (Sierra, 2011), que es altamente complejo y diverso; incluye varios tipos distintos de ecosistemas, arroyos, lagos, estanques y ríos; estuarios, litorales, y aguas oceánicas profundas, estos ecosistemas tienen diferentes componentes bióticos y abióticos y características únicas (Rand, 1995).

Las principales fuentes de contaminación del agua incluyen desechos inorgánicos y orgánicos, desechos industriales, compuestos del petróleo, desechos municipales, desechos provenientes de la agricultura, pesticidas y la industria minera (Yu, 2005). Entre los contaminantes inorgánicos se encuentran los metales y metaloides y un número de moléculas relativamente simples como el fosfato y el amonio (Wright y Welbourn, 2002).

Los metales son ampliamente utilizados en la sociedad moderna, como consecuencia pueden impactar al medioambiente de forma negativa (Boyd, 2010) y su toxicidad es preocupante debido a las consecuencias ecológicas, evolutivas, nutricionales y

medioambientales (Jaishankar *et al.*, 2014), pues los metales son persistentes, no degradables (Mohammed *et al.*, 2011) y pueden bioconcentrarse y biomagnificarse entrando a las cadenas tróficas, incluido el hombre (Hazrat y Ezzat, 2018).

El aporte de contaminantes a los ecosistemas acuáticos crea el riesgo de pérdida del hábitat de muchas especies de organismos que representan una fuente de alimento o productos de interés económico para el hombre (Sierra, 2011), pueden causar enfermedades a humanos y animales. Los contaminantes tóxicos pueden modificar los procesos biológicos como la inhibición del crecimiento, la reproducción y la migración de especies. Por lo tanto, monitorear y detectar los contaminantes químicos es importante para la seguridad de humanos y la biota en la tierra (Hassan *et al.*, 2016).



## 2. Marco Teórico

### 2.1 Pruebas de toxicidad

En países desarrollados, existen esquemas normativos que incluyen de manera importante la determinación de los efectos de los contaminantes sobre los sistemas biológicos, tanto en exposiciones de corto como de largo plazo (Hobbs *et al.* 2005).

La evaluación de los efectos tóxicos de los contaminantes se realiza a través de la exposición controlada de organismos de prueba, a concentraciones establecidas de compuestos químicos (puros o en mezclas) o bien directamente a diluciones de muestras de efluentes contaminantes, muestras de agua de sistemas receptores de descargas, o muestras de formulaciones químicas comerciales, de composición conocida o desconocida, cuya toxicidad desea determinarse (Martínez-Jerónimo, 2008).

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 ecosistema, de los peligros ocasionados por las sustancias contaminantes arrojadas al ambiente por el hombre; por lo tanto las pruebas de toxicidad son herramientas necesarias si queremos evaluar los riesgos potenciales producidos por el estrés antropogénico en ecosistemas acuáticos (Snell y Janssen, 1998).

Las pruebas de toxicidad tienen aplicación en casos como: a) el estudio sobre los efectos tóxicos de los contaminantes sobre un organismo, b) en los estudios sobre los efectos tóxicos de los contaminantes sobre un determinado cuerpo de agua, c) en el establecimiento de la máxima concentración permisible en el agua de una sustancia tóxica, d) en la determinación de la efectividad de los procesos de tratamiento de aguas residuales, e) en el establecimiento de los límites autorizados de descargas de efluentes y la f) la determinación de la legislación ambiental (Sierra, 2011).

El fundamento principal sobre el cual todas las pruebas de toxicidad se basan es el reconocimiento de que la respuesta de los organismos vivos a la presencia de agentes tóxicos depende de la dosis del agente tóxico; basados en este principio, las pruebas de toxicidad

acuática son diseñadas para describir una relación concentración-respuesta, denominada como curva concentración-respuesta cuando el efecto medido se representa gráficamente con la concentración.

Las pruebas de toxicidad aguda son usualmente diseñadas para evaluar la relación concentración respuesta para la sobrevivencia (Hoffman *et al.*, 2003, Nikinmaa, 2014), estas pruebas evalúan la toxicidad relativa de un químico a organismos acuáticos seleccionados tras una exposición a corto plazo a varias concentraciones del químico; comúnmente el efecto criterio para peces es mortalidad; para invertebrados, inmovilidad y pérdida de equilibrio; y para algas, crecimiento (Rand, 1995); la prueba se realiza por un período predeterminado de tiempo para estimar la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>, concentración donde el 50% de los organismos prueba muere) (Hoffman *et al.*, 2003).

Los estudios crónicos evalúan efectos subletales tal como crecimiento, reproducción, comportamiento o efectos bioquímicos y son generalmente diseñados para proporcionar un estimado de la Concentración Efectiva Media (CE<sub>50</sub>, Concentración donde se observa una reducción del 50% en el parámetro analizado) a 48 o 96 horas (Hoffman *et al.*, 2003, Nikinmaa, 2014). En una prueba de toxicidad crónica completa, los organismos prueba son expuestos un ciclo de vida reproductiva; las pruebas de toxicidad de ciclo de vida parcial solo involucran varios estados sensibles del ciclo de vida, en pruebas de toxicidad crónicas completa la exposición es generalmente iniciada con el huevo o cigoto y continúa a través del desarrollo y la eclosión del embrión, crecimiento y desarrollo de los organismos jóvenes, seguido de la madurez sexual y la reproducción para producir un organismo de segunda generación (Rand, 1995), estas pruebas permite la detección de efectos adversos más sutiles, como la reducción del crecimiento y la reproducción. La evaluación de estos efectos de la exposición prolongada a la muestra puede proporcionar una estimación directa del umbral del efecto del tóxico. Durante las pruebas de ciclo de vida con varias especies de peces e invertebrados, se ha demostrado constantemente que ciertas etapas de desarrollo son más sensibles que otras. El uso de pruebas más cortas con las primeras etapas de desarrollo también puede predecir la toxicidad crónica. Estos métodos se han desarrollado para proporcionar formas más rápidas y menos costosas de medir la toxicidad crónica para los organismos acuáticos (Hydrosphere research, 2020).

Los químicos hidrofóbicos pueden persistir en el agua y presentar toxicidad acumulativa en los organismos; los químicos con estas características son considerados para pruebas de bioconcentración, las cuales son definidas como la acumulación neta de un material del agua dentro y sobre de un organismo acuático resultado de la absorción y la depuración simultánea; las pruebas de bioconcentración se llevan a cabo para evaluar el potencial de un químico para acumularse en los organismos acuáticos, es denominado como el Factor de Bioconcentración (BCF, por sus siglas en inglés) (Hoffman *et al.*, 2003).

La CL50 es una función de la toxicidad intrínseca de una sustancia y de su equilibrio de distribución entre el organismo y su entorno. Los valores de CL50 reflejan tanto el potencial de bioconcentración de un compuesto como su toxicidad intrínseca, es decir, la potencia toxicológica de una sustancia química una vez dentro del organismo. La carga corporal letal y la CL50 se relacionan de acuerdo a la ecuación (Kenneth y Seinen, 2010):

$$CCL = FBC * CL50$$

Donde la CCL es la concentración del compuesto dentro del organismo en el momento de la muerte y el factor de bioconcentración (FBC) es la relación de concentración de la sustancia química en el organismo y el agua en equilibrio (van Wezel y Jonker, 1998, Kenneth y Seinen, 2010).

Distribución de sensibilidad de especies. Las pruebas de toxicidad (agudas o crónicas) dan como resultado una concentración que produce un efecto negativo en individuos o poblaciones específicas, sin embargo, cada especie presenta diferente sensibilidad ante la presencia de un toxico. Esta variabilidad se puede representar por medio de la construcción de una curva a partir de la distribución de sensibilidad de especies (SSD por sus siglas en inglés, Species Sensitivity Distribution), por lo cual, la toxicidad de un metal en un grupo de especies se describe por una distribución estadística. Esta curva nos permite calcular la concentración de peligro 5% (HC5, por sus siglas en inglés, Hazard Concentration), esto significa que solo el 5% de las especies es afectada (Posthuma *et al.* 2001, Garner *et al.* 2015). Este método tiene como función, proponer criterios para la calidad del agua y proteger la mayor cantidad de especies posibles.

## 2.2 Organismos de Prueba

Para la evaluación de los efectos tóxicos de los contaminantes químicos es importante la adecuada elección de los organismos prueba que se emplearán (Martínez-Jerónimo, 2008); varios criterios deberán ser considerados en la selección de organismos para prueba de toxicidad: a) especies con un amplio rango de sensibilidad; b) especies ampliamente disponibles y abundantes; c) cuando sea posible, las especies deben ser indígenas o representativas del ecosistema que recibe el impacto, d) deben ser incluidas especies que son importantes recreativamente, comercialmente y ecológicamente, e) especies que sean de fácil mantenimiento y cultivo en el laboratorio y f) si hay información sobre una especie (por ejemplo, su fisiología, genética y comportamiento) los datos de la prueba puede ser más fácilmente interpretados (Rand, 1995; Landis y Yu, 1999). Con frecuencia se recurre a especies planctónicas como organismos de prueba (Martínez-Jerónimo, 2008) ya que cumplen con estas características.

### 2.2.1 Microalgas

Las microalgas se caracterizan por sus rápidas tasas de crecimiento y distribución generalizada en ambientes naturales (Guanzon *et al.*, 1994), son uno de los organismos más importantes debido a que constituyen el primer eslabón de la cadena trófica; como productor primario, el fitoplancton permite la entrada de energía al ecosistema, regula el régimen gaseoso y tiene acción depuradora, por lo que se considera uno de los indicadores más importantes de las alteraciones del medio acuático; se ha verificado su sensibilidad a los efluentes industriales y se ha demostrado ser una herramienta válida en el monitoreo y control de los programas de reducción de toxicidad, considerándose indicadores primarios de contaminación (Gómez y Ramírez, 2009).

Las microalgas pueden emplearse, en pruebas de toxicidad de respuesta rápida y en la evaluación directa de la toxicidad, estos métodos son rápidos, fáciles y sensibles, durante muchos años las pruebas con algas se han utilizado para mostrar la disponibilidad de nutrientes para las plantas en los ríos, lagos y embalses, de manera general, las pruebas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pueden usarse para determinar el estado de eutrofización, la limitación de nutrientes y la influencia tóxica de aguas residuales industriales (Hassan *et al.*, 2016).

Los metales están presentes en los ecosistemas acuáticos en una amplia variedad de formas fisicoquímicas que tienen efectos importantes sobre los organismos acuáticos. Los efectos biológicos de los metales dan lugar a cambios estructurales en las comunidades microplanctónicas de los cuerpos de agua. En particular, reducen la abundancia de especies de algas y la producción de algas, alterando la estructura de la comunidad de algas. Esto implica que algunas especies son sensibles a estos contaminantes, mientras que otras se vuelven tolerantes, tales signos son extremadamente peligrosos para toda la vida acuática (Guanzon *et al.*, 1994).

El uso de algas como organismos de prueba está ganando apoyo debido a su simplicidad estructural, abundancia en la naturaleza y la facilidad de obtener cultivos de algas para pruebas de laboratorio comercialmente. Además, las pruebas de toxicidad de algas son rápidas, económicas y se pueden usar de manera para evaluar una detección efectiva de aquellas sustancias tóxicas que se encuentran en concentraciones bajas (Guanzon *et al.*, 1994). Algunas especies de microalgas que se utilizan para pruebas de toxicidad son *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus acuminatus*, *Dunaliella sp.*, *Monochrysis sp.* y *Dunaliella tertiolecta* *Chlamydomonas variabilis*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella vulgaris* (Hassan *et al.*, 2016).

*Nannochloropsis oculata* es una de las seis especies de algas que se encuentran en el género *Nannochloropsis* y se aisló originalmente frente a las costas de Escocia (Kagan y Matulka, 2015); se hallan en ecosistemas marinos y de agua dulce (Fogg, 1995) se han utilizado como fuente de alimento en acuicultura, proporcionando una fuente de alta de proteínas, pigmentos y ácidos grasos omega-3 (Sukarni *et al.*, 2014). *Nannochloropsis* se usa en pruebas experimentales toxicológicas en condiciones de laboratorio porque es fácil mantener esta especie, económico y proporciona resultados precisos (Ates *et al.* 2020).

### 2.2.2 Ciliados

Los protozoos, principalmente los ciliados, son usados como bioindicadores de contaminación por químicos, especialmente en medioambientes acuáticos (Miyoshi *et al.*, 2003). Los protistas son organismos unicelulares eucariotas y tienen gran importancia en la cadena alimenticia, esta característica los hace un modelo adecuado para predecir los efectos de los productos químicos en las comunidades acuáticas. Los protozoos ciliados representan un componente básico tanto del microplancton como del microbentos, donde desempeñan papeles críticos tanto cuantitativa como cualitativamente. Estos microorganismos median el flujo tanto de sustancias biológicas como de energía de un nivel trófico al siguiente (Madoni y Romeo, 2006).

Los protozoos contienen una sola célula, características necesarias para una vida independiente; los ciliados son el grupo más complejo de los protistas caracterizado por la presencia de organelos en forma de pelo llamados cilios; los ciliados de agua dulce varían de tamaño de 50  $\mu\text{m}$  (*Tetrahymena*) a 3 mm (*Spirostomum ambiguum*); su reproducción es asexual ocurre por fisión binaria y la tasa de crecimiento depende del tamaño del ciliado con tiempos de duplicación de 4-5 h a 72 h para *Tetrahymena termopila* y *Spirostomum ambiguum*, respectivamente (Ferard y Blaise, 2013).

Los protozoos ciliados son muy numerosos tanto en ambientes acuáticos como en todo tipo de sistemas de tratamiento biológico; desempeñan un papel importante en la purificación y la regulación general de toda la comunidad acuática. Se ha demostrado que los ciliados mejoran la calidad del efluente a través de su participación en la regulación de la biomasa bacteriana, mediante la eliminación de la mayoría de las bacterias dispersas (Madoni *et al.*, 1992).

Estudios sobre aguas contaminadas con metales pesados han mostrado cambios en la dinámica de las comunidades de protozoos (Gong *et al.*, 2014, Rehman *et al.*, 2010, Miyoshi *et al.*, 2003). La diversidad estructural y funcional de estas comunidades de protozoos permite una evaluación de los efectos y el peligro que tienen los metales tóxicos en varios aspectos del ecosistema, como el mantenimiento de la diversidad de especies y el equilibrio de la dinámica de la cadena alimentaria. En este contexto, el ensayo ciliado se ha convertido

en una herramienta valiosa para la detección de perturbaciones ambientales y para la evaluación del estado trófico (Madoni y Romeo, 2006).

*Paramecium caudatum* es uno de los ciliados usados para pruebas de toxicidad acuática; sus características facilitan el estudio de procesos fisiológicos y los efectos de la contaminación del agua, mediante el monitoreo de motilidad, también ha sido usado ampliamente para evaluar los efectos tóxicos de varios colorantes alimenticios, carcinógenos, químicos sintéticos, pesticidas y contaminantes (Rao *et al.*, 2006). Otras especies de paramecios utilizados en pruebas de toxicidad son *Tetrahymena pyriformis*, *P. trichium*, *P. bursaria* entre otros (Miyoshi *et al.*, 2003).

### **2.2.3 Rotíferos**

Los rotíferos juegan un papel fundamental en muchos ecosistemas de agua dulce, ya que están presentes en casi todos los tipos de hábitat de agua dulce, desde grandes lagos permanentes hasta pequeños charcos temporales y agua intersticial y capilar; desde los lagos mineros ácidos hasta los lagos natrón y el océano abierto, desde los lagos Alpinos hiperoligotrópicos hasta los estanques de aguas residuales (Segers, 2008).

Aunque son un phylum muy pequeño son muy importantes en los ecosistemas acuáticos, porque sus tasas reproductivas son rápidas, por lo cual pueden poblar nichos vacíos con extrema rapidez (Snell y Janssen, 1995), comúnmente se encuentran en densidades de hasta 1,000 individuos por litro, y son importantes alimentadores de filtro de algas y bacterias, convierten la producción primaria para que pueda ser utilizada por los consumidores secundarios y logran esta transformación con mucha eficiencia, produciendo arriba del 30% de la biomasa total del plancton (Nogrady *et al.*, 1993). Los rotíferos son uno de los tres grupos principales de zooplancton de agua dulce en estudios limnológicos, junto con el Cladóceras (Anomopoda) y el Copépoda debido a su ubicuidad y abundancia (Segers, 2008).

Los rotíferos son un grupo de invertebrados microscópicos acuáticos y semiacuáticos que comprenden cerca de 2150 especies pseudocelomadas no segmentadas, bilateralmente simétricas (Nogrady *et al.*, 1993; Wallace, 2002), miden entre 50–2,000  $\mu\text{m}$ , caracterizados por la presencia de una corona ciliada anterior, una pared rígida del cuerpo llamada lorica

que tiene apéndices variables y un órgano faríngeo especializado, el mastax, que contiene elementos duros, denominado trophi. Una de las características importante de este grupo es su capacidad de dispersión, los monogonontes forman quistes encapsulados o individuos anhidrobióticos como los bdelloideos (Segers, 2008). Se dividen en tres clases, la clase seisonidea, se reproduce sexualmente. Los monogonontes y los bdelloideos se reproducen partenogénicamente. En la clase monogononta la reproducción partenogénica es prevaeciente, pero bajo cierta circunstancia ocurre reproducción sexual, los bdelloideos son el grupo más diverso de metazoos en los que la reproducción es solo por partenogénesis diploide y mitótica (Nogrady *et al.*, 1993).

Debido a su gran disponibilidad y facilidad de cultivo, los rotíferos se han convertido en un modelo útil para estudios en ecología acuática, en especiación, evolución ecológica y evolución del sexo, en dinámica poblacional y ecotoxicología; otras características que los hacen apropiados para pruebas de ecotoxicidad acuática y como bioindicadores sensibles en la calidad del agua son: su tamaño pequeño, sensibilidad a un gran número de sustancias tóxicas, su reproducción predominantemente partenogénica, alta densidad de población y rápido crecimiento de la tasa poblacional (Dahms *et al.*, 2011).

Diferentes tipos de pruebas se han desarrollado con rotíferos, estas pruebas miden parámetros tan diversos como mortalidad, reproducción, comportamiento y fisiología, pruebas bioquímicas o moleculares, y microcosmos (Snell y Janssen, 1998).

Se han realizado estudios con pruebas de toxicidad que han proporcionado información sobre los efectos que los metales tienen sobre los rotíferos (Snell y Persoone, 1989a, b; Snell y Jassen, 1997; Snell, 1998, Alvarado-Flores *et al.*, 2012; Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2013; Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2015).

*Euchlanis dilatata* es un rotífero litoral cosmopolita, bentónico (King, 1967), tiene sensibilidad a los tóxicos y por a su asociación con el hábitat de la interfaz agua-sedimento es una especie útil para evaluar los posibles efectos tóxicos de contaminantes asociados a los sedimentos (Arias-Almeida and Rico-Martínez, 2011).

#### 2.2.4 Cladóceros

Los cladóceros también llamados pulgas de agua son crustáceos pequeños que constituyen la mitad de la Clase Branchiopoda (Ruppert y Barnes, 1996), representan un eslabón importante dentro de la cadena trófica, se alimentan de algas, son un eslabón entre los productores primarios y los peces; los cladóceros son organismos partenogenéticos, es decir, tienen la habilidad de reproducirse sin machos (Henry, 1988).

Los cladóceros se utilizan ampliamente para pruebas de toxicidad acuática porque se encuentran fácilmente en los cuerpos de agua, se adaptan fácilmente a las condiciones de laboratorio, requieren poco espacio y son muy sensibles a los químicos (Mount y Norberg, 1984), además ser mencionó son partenogenéticos, esta habilidad simplifica significativamente su uso como organismos para las pruebas de toxicidad porque su período de reproducción es corto y simple (Henry, 1988). Entre los cladóceros, *Daphnia magna* es la especie más utilizada y ha sido propuesta como especie de referencia en múltiples protocolos estandarizados de entidades reguladoras y organismos internacionales involucrados en la normalización de procedimientos de prueba (Mount y Norberg, 1984; Martínez-Jerónimo *et al.*, 2000).

*Daphnia magna* y *Ceriodaphnia sp.*, son los cladóceros que más se utilizan para pruebas toxicológicas y existe información sobre las técnicas de cultivo y la sensibilidad a las sustancias tóxicas; los requisitos de temperatura, luz y nutrientes están bien definidos; ambos cladóceros se pueden usar para realizar pruebas de suelo, sedimento y agua; los cladóceros son de libre natación y, por lo tanto, son más apropiados para examinar agua y no sedimentos (Henry, 1988).

Existe una amplia base de datos de toxicidad de muchos compuestos para *Daphnia magna* y su sensibilidad es comparada con otros organismos tales como peces, rotíferos, copépodos (Neiderlehner *et al.*, 1984). En general, se ha encontrado que los cladóceros son más sensibles que los peces a las sustancias tóxicas (Henry, 1988). Los cladóceros tienen un sistema nervioso, lo cual sugiere la presencia de la acetilcolina (Ach), este neurotransmisor normalmente es hidrolizado por la acetilcolinesterasa, la cual es muy sensible a diferentes contaminantes, entre los que se pueden mencionar a los metales pesados, detergentes e hidrocarburos policíclicos (Martínez-Tabche *et al.*, 1997).

*Moina macrocopa* es un microcrustáceo planctónico presente en cuerpos de agua dulce como salobre, con temperaturas que oscilan entre 5 y 30 °C y con pH neutro a ligeramente alcalino; tolera bajas concentraciones de oxígeno y alcanza grandes densidades en sitios con un alto contenido de materia orgánica (Martínez-Jerónimo y Gutiérrez-Valdivia, 1991).

*M. macrocopa* es filtrador no selectivo (Martínez-Jerónimo y Gutiérrez-Valdivia, 1991), y juega un papel clave en las redes alimentarias de ambientes acuáticos (Vignatti *et al.*, 2013). Es utilizado como alimento vivo en acuicultura por lo que tiene importancia económica (Valdivia-Villar, 1988; Elías-Gutiérrez, 1995) y como bioindicador de la calidad del agua (Nandini *et al.*, 2004).

### **2.3. Metales**

Los metales se redistribuyen de manera natural en el ambiente por medio de ciclos bio-geológicos; el agua de lluvia disuelve las rocas y minerales y los transportan físicamente hacia arroyos y ríos, deposita y arranca materiales desde el suelo y después transporta estas sustancias hacia el océano donde se precipitan como sedimento o se captan en el agua de lluvia para transportarse a otro sitio; los ciclos biológicos incluyen bioconcentración por plantas y animales, e incorporación hacia ciclos de alimentos; estos ciclos también tienen origen antropogénico (Klaassen y Watkins, 2001), como la minería, la combustión de combustibles fósiles y los liberados en las aguas residuales (Calow, 1994); la actividad industrial puede acortar mucho el tiempo de residencia de metales en minerales, forma nuevos compuestos, aumentando la distribución mundial (Klaassen y Watkins, 2001), hay ahora suficiente evidencia de que los humanos han contaminado el medioambiente con metales (y otros contaminantes) desde los polos, los trópicos y montañas hasta los profundos abismos (Calow, 1994).

Los metales se han utilizado en muchas áreas diferentes durante miles de años. El plomo se ha utilizado durante al menos 5000 años, sus usos fueron como material de construcción, pigmentos para vidrios cerámicos y tuberías para transportar agua. En la antigua Roma, el acetato de plomo se usaba para endulzar el vino viejo. Los romanos supuestamente utilizaron el mercurio como ungüento para aliviar el dolor de la dentición en los bebés, y más tarde (desde el siglo XII hasta finales del siglo XIX) se empleó como

remedio para la sífilis. Claude Monet usó pigmentos de cadmio ampliamente a mediados del siglo XIX, pero la escasez del metal limitó el uso en materiales de artistas hasta principios del siglo XX (Jarüp, 2019). En la actualidad los metales son usados ampliamente en electrónicos, máquinas y artefactos de uso diario, además de su uso en aparatos de alta tecnología (Yu, 2005; Sharma, 2015).

Las principales propiedades físicas y químicas que distinguen a los metales son: a) en estado elemental tienen un brillo característico, b) son maleables y dúctiles, c) forman iones cargados positivamente (cationes), d) tienen altos puntos de fusión y de ebullición, e) tienen una densidad relativa alta en el rango de los 3.5 y 7 gcm<sup>3</sup>, f) forman óxido bases y g) usualmente son buenos conductores de calor y electricidad (Wright y Welbourn, 2002). En la literatura ha sido utilizado ampliamente el término “metal pesado” refiriéndose a los metales con una densidad relativa específica, pero esto incluye a los lantánidos y actínidos, los cuales no son considerados como “pesados” en base a sus propiedades químicas; entre los ecotoxicólogos, el término de “metales pesados” es generalmente utilizado para referirse a metales que se ha demostrado que causan problemas medioambientales; estos son: Cd, Hg, Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Co, V, Ti, Fe, Mn, Ag y Sn; además, los metaloides As y Se tienen algunas propiedades de metales y otras de no metales, son generalmente incluidos (Calow, 1994; Boyd, 2010).

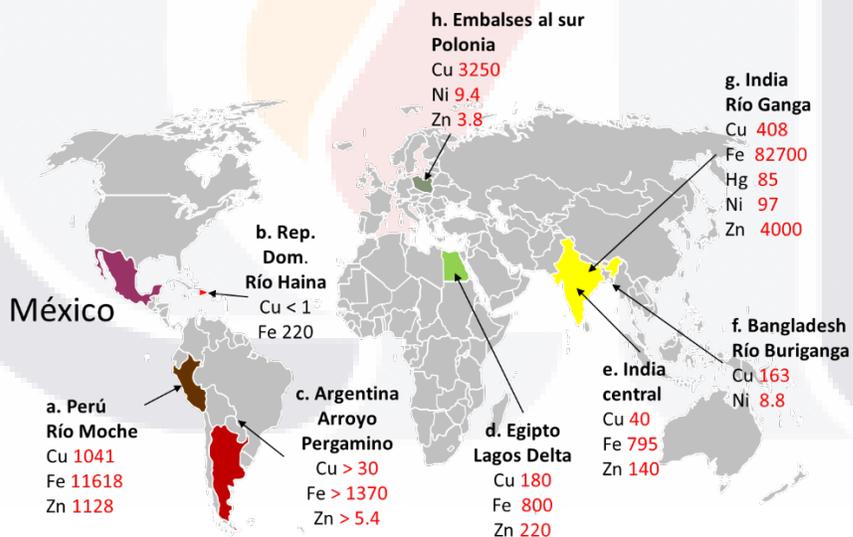
Muchos metales son importantes en el metabolismo de animales y plantas, donde, como micronutrientes, juegan un papel importante en metabolismo celular y el crecimiento; hay metales esenciales para el desarrollo normal de las funciones metabólicas como el níquel, el zinc, el hierro y el cobre y otros no esenciales como el mercurio, un aumento en las concentraciones de estos metales puede causar muerte, problemas de salud o retardo en el crecimiento; algunos metales traza no esenciales como el mercurio pueden ser tóxicos en concentraciones comúnmente observadas en sedimentos y aguas naturales (Rand y Petrocelli, 1985).

Es un hecho que todos los cuerpos de agua están contaminados por metales, y a diferencia de los compuestos orgánicos, no experimentan transformación en los organismos de los animales acuáticos. Como resultado, los metales tendrán ciclos biológicos muy lentos.

Elementos como Cu, Hg, y Zn se consideran más peligrosos en el aspecto ecotoxicológico (Golovanova, 2008).

La presencia de Cu, Fe, Hg, Ni y Zn se ha reportado en diversos cuerpos de agua alrededor del mundo (Figura 1), y las concentraciones presentes en estos lugares sobrepasan los límites permisibles de las normas de calidad de agua para el cuidado de la vida acuática (Figura1, Cuadro 1).

En México, se ha reportado presencia de metales en ríos, lagos, cultivos, suelos y aire de zonas urbanas, así como en ambientes a costeros y marinos, en nuestro país la minería es una de las causas principales de la contaminación por metales entre otras industrias (Covarrubias y Cabriales, 2017). En agua existen muchos estudios que reportan concentraciones de Cu, Fe, Hg, Ni, y Zn que rebasan los límites permisibles de las normas de calidad del agua, Figura 1.

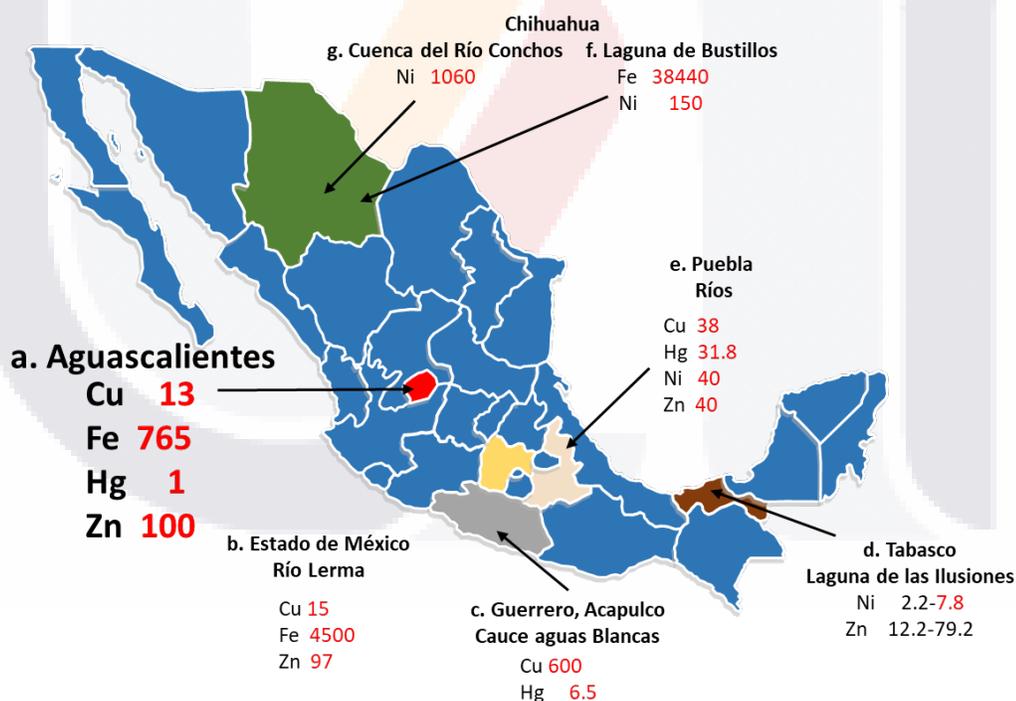


**Figura 1.** Presencia Cu, Fe, Hg, Ni y Zn reportados en diversos cuerpos de agua alrededor del mundo. Todos los valores están en µg/L, en rojo concentraciones que sobrepasan los límites permisibles de calidad del agua. (a. Huaranga Moreno *et al*, 2012; b. Contreras-Pérez *et al.*, 2004; c. Reynoso y Andriulo, 2009; d. Saeed y Shaker, 2008; e. Tiwari *et al.*, 2015; f. Ahmad *et al.*, 2010; g. Paul, 2017; h. Boguslaw *et al.*, 2014).

**Cuadro 1.** Límites máximos recomendados en agua para los metales Cu, Fe, Hg, Ni y Zn.

Metal	CEQG [µg/L]	AU & NZ [µg/L]	EPA [µg/L]	CE-CCA [µg/L]	NOM [µg/L]
<b>Cu</b>	2.36	<b>1</b>		2.47	4000
<b>Fe</b>	<b>300</b>	1000		1000	
<b>Hg</b>	<b>0.026</b>	0.06	1.4	0.01	5
<b>Ni</b>	9.5	8	470	<b>5</b>	2000
<b>Zn</b>	30	<b>2.4</b>	120	39	10000

CEQG= Canadian Environmental Quality Guidelines for the protection of aquatic life. CE-CCA= Criterios Ecológicos de Calidad del Agua CE-CCA-001/89. Calidad para la protección de la vida de agua dulce. AU & NZ= Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality. NOM-001-ECOL-1996 Norma Oficial Mexicana Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales y bienes nacionales. EPA= U.S. Environmental Protection Agency. National. Recommended Water Quality Criteria - Aquatic Life Criteria. En negritas los valores más sensibles.



**Figura 2.** Presencia de Cu, Fe, Hg, Ni y Zn en agua en México. Concentraciones (µg/L) en agua concentraciones que sobrepasan los límites permisibles (rojo). (a. Guzmán-Colis *et al.*, 2011; b. Zarazúa *et al.*, 2013; c. Dimas *et al.*, 2015; d. Flores *et al.*, 2018; e. Mancilla-Villa *et al.*, 2011; f. Quintana *et al.*, 2015; g. Quintana *et al.*, 2008)

### 2.3.1 Cobre

El Cobre (Cu) es un metal de transición, su peso atómico es de 63.54 y número atómico es 29; en su forma metálica es muy maleable y dúctil y un excelente conductor de calor y electricidad, su punto de fusión es de 1083 °C; tiene dos estados de valencia, cuproso,  $\text{Cu}^{+1}$ , y cúprico,  $\text{Cu}^{+2}$ ; en la litosfera se presenta en forma metálica en concentraciones traza y como minerales de Cu, incluyendo pirita de cobre y malaquita; ha sido usado en forma metálica pura o como aleación con otros metales, como bronce (cobre-estaño) y latón (cobre-zinc); en forma metálica, pura o aleación, el cobre ha sido usado para hacer herramientas, ornamentos, estatuas, joyería, monedas o vasijas, así como para cableado eléctrico y fontanería; las sales de cobre han sido usadas como fungicidas, molusquicidas y algicidas; los principales procesos por lo que resulta la movilización de Cu dentro del medioambiente son la extracción de minerales, la agricultura y desechos industriales (Wright y Welbourn, 2002; Nikinmaa, 2014).

El cobre es un nutriente esencial traza para todos los organismos vivos; este es un metal de transición que puede ir de cobre oxidado a cobre cuproso reducido, y puede aceptar o donar electrones, esta actividad redox hace que el cobre sea un cofactor esencial para muchas rutas enzimáticas como la oxidación respiratoria, la síntesis de neurotransmisores, el metabolismo del hierro y la pigmentación. Esta misma actividad redox puede catalizar reacciones de Fenton, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) (van den Berghe y Klomp, 2010). Los procariontes y eucariontes tienen mecanismos para transportar Cu dentro de las células; el proceso del transporte celular de cobre y su inserción dentro de las metaloenzimas resulta de una elaborada interacción entre las proteínas transportadoras del ion metal específico y proteínas chaperón asociadas (Wright y Welbourn, 2002).

El Cu en altas concentraciones tiene efectos dañinos en el cuerpo humano; altos niveles de exposición de polvo de Cu causan irritación de boca, ojos y nariz y puede causar náuseas y diarrea; exposiciones continuas pueden causar daño renal e incluso muerte; el cobre también es tóxico a una variedad de organismos acuáticos incluso en bajas concentraciones (Sharma, 2015).

Los lagos de agua dulce cercanos a fuentes de contaminación como: operaciones mineras y fundición, por ejemplo, pueden alcanzar hasta 1581 mg/Kg en sedimentos. Asimismo, los sitios marinos cercanos a los puertos industriales pueden tener cobre en sedimentos de hasta 440 mg/kg. Es probable que los organismos bentónicos estén expuestos a partículas y cobre disuelto en aguas intersticiales y suprayacentes (Magesky y Pelletier, 2018).

La biodisponibilidad y toxicidad del Cu para los organismos acuáticos depende de la concentración total del Cu y de su especiación; en invertebrados acuáticos, en altas concentraciones causa daños en las branquias y en los peces interfiere con la osmorregulación; elevadas concentraciones de Cu interfieren con el transporte de oxígeno y el metabolismo energético; la hipoxia tisular es la causa de muerte y está asociada con la reducción en la actividad de las enzimas que regulan la rutas de síntesis de ATP; en algas de agua dulce, el Cu aumenta su permeabilidad (Eisler, 1993).

### **2.3.2 Hierro**

El hierro (Fe), metal más usado por el hombre históricamente, es el cuarto más abundante en la corteza terrestre (Lide, 2003). El Fe es un metal de transición con una densidad de 7.87 g/cm<sup>3</sup> y un peso molecular de 55.9. El Fe se encuentra en muchos minerales, siendo los más importantes: magnetitas, hematita, goethita, pirrotita, siderita, ilmenita y pirita; es un componente importante en los suelos (FEQGs, 2019). El Fe presenta tres estados de oxidación: 0, +2 y +3; es uno de los elementos más importantes en relación a los gradientes redox verticales que se manifiesta en los cuerpos de agua dulce como producto de una continua transformación de Fe (+2) a Fe (+3) y viceversa; el Fe (+2) es el estado de oxidación predominante en el estrato reductor de la columna de agua conformada por los sedimentos y es oxidado a Fe (+3) al ingresar en forma disuelta en la porción oxigenada de dicha columna; ello da lugar a la formación de hidróxidos de baja solubilidad que se precipitan en los sedimentos, donde por reducción se genera el Fe (+2), que se incorpora a la fase acuosa reiniciándose el ciclo de transformaciones (De Vitre *et al.*, 1994).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Las fuentes antropogénicas de hierro en las aguas superficiales a menudo están relacionadas con las actividades mineras. Además, las piritas de hierro ( $\text{FeS}_2$ ), que son comunes en las vetas de carbón, están expuestas a la intemperie y a la acción bacteriana durante la extracción, cuya oxidación produce ácido sulfúrico y la liberación de hierro ferroso soluble ( $\text{Fe}^{+2}$ ) (FEQGs, 2019).

La presencia del Fe es esencial para la mayoría de los organismos, en los cuales forma parte de varias enzimas y proteínas; corresponde destacar su papel fundamental en el transporte de oxígeno en los vertebrados y algunos grupos de invertebrados, ya que forma parte de la hemoglobina; el Fe desempeña un papel muy importante en las aguas naturales, especialmente en lagos, como un modulador de nutrientes y otras sustancias tales como fósforo y metales traza, alterando su biodisponibilidad (De Vitre *et al.*, 1994; Nikinmaa, 2014).

La absorción de Fe en los animales acuáticos se produce a partir de dos fuentes: alimentos y agua. El Fe disuelto (II) y otros metales se toman predominantemente del agua, mientras que los precipitados de Fe (III) pueden contribuir significativamente a las concentraciones de Fe en la dieta de los animales acuáticos. Dentro de los animales, el Fe se transporta activamente a través de las membranas por endocitosis (Luoma 1983, Roesijadi y Robinson, 1994). Sin embargo, al igual que lo que ocurre con otros elementos esenciales, si su concentración en el medio supera un cierto umbral se convierte en una sustancia tóxica para los organismos acuáticos; de acuerdo a los valores seleccionados para invertebrados, cierta especie de isópodo, *Asellus aquaticus*, para el que se observa una CL50 que llega 124 mg/L (Furmanska, 1979).

Un mecanismo potencial de toxicidad por hierro incluye su papel en el ADN y el daño de la membrana. Los estudios de vertebrados han demostrado que las altas concentraciones celulares de hierro, en particular el hierro ferroso, pueden causar degeneración celular. El mecanismo de este proceso no se comprende completamente, pero incluye la autooxidación catalizada por hierro de la dopamina, que a su vez genera radicales libres de hidroxilo. Junto con el oxígeno, estos radicales libres son altamente reactivos y pueden causar daño oxidativo específico del sitio cuando se producen en exceso (Vuori, 1995).

### 2.3.3 Mercurio

El Mercurio (Hg) es un metal que se dispersa naturalmente a través del ecosistema; la contaminación del medioambiente causada por Hg es debido a fuentes naturales y antropogénicas; las fuentes naturales incluyen acción volcánica, erosión de sedimentos que contienen Hg, y emisiones de gas de la corteza terrestre; la mayoría del Hg viene de fuentes antropogénicas, minería, combustión de combustible fósil, presencia de Hg en compuestos utilizados en agricultura y en la fundición de metales; además el desecho de Hg se encuentra en baterías, focos, y procesos de recuperación de oro (Yu, 2001).

El número atómico del Hg es 80, peso atómico de 200.59; en forma metálica es muy volátil a temperatura ambiente. No se conoce función biológica para el Hg. Este elemento tiene tres estados químicos importantes para entender su comportamiento en el medioambiente: a) el Hg elemental o metálico, es líquido y volátil a temperatura ambiente, es la mayor forma en el aire y es escasamente soluble en agua, b) el Hg inorgánico divalente, se simboliza como  $\text{Hg}^{+2}$ , forma fácilmente sales con varios iones y aniones, las sales de mercurio son moderadamente solubles en agua y en la atmosfera se asocia fácilmente con agua, c) Metilmercurio, es la forma orgánica más importante. Monometilmercurio se simboliza como  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , es soluble en agua y es bastante estable por la presencia de un enlace covalente carbón-mercurio; dimetilmercurio, se simboliza como  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ , es menos estable (Wright y Welbourn, 2002; Nikinmaa, 2014). Los microorganismos convierten el Hg elemental a metilmercurio a través de un proceso llamado metilación; el metilmercurio en esta forma puede comenzar ruta hacia arriba de la cadena alimenticia acuática (Jaishankar *et al.*, 2014).

Las funciones biológicas del Hg son desconocidas. Sin embargo, incluso los elementos esenciales, si están en concentraciones excesivas, son tóxicos para los organismos (Golovanova, 2006). La EPA ha declarado al cloruro de mercurio y metilmercurio como altamente carcinogénicos (Jaishankar *et al.*, 2014); el sistema nervioso es muy sensible a todos los tipos de Hg, la exposición a Hg puede alterar las funciones cerebrales, causar temblores, problemas de memoria, irritabilidad y cambios en la visión o audición (Jaishankar *et al.*, 2014; Sharma, 2015).

En concentraciones muy bajas el Hg puede ser letal para algunas especies de algas y afectar el crecimiento de otras; los organomercuriales pueden retardar el crecimiento y viabilidad de varias especies de algas marinas; la alta sensibilidad del fitoplancton a los compuestos de Hg puede ser debido al alto contenido lipídico en la membrana; los organismos de agua dulce y marinos y sus depredadores normalmente contienen más Hg que los animales terrestres (Yu, 2001).

Muchos estudios sobre los efectos biológicos del Hg realizados en cladóceros como como *D. magna* indican que el Hg y otros compuestos asociados pueden inhibir enzimas digestivas específicas. En huevos partenogenéticos de *D. carinata* también se ha observado que inhibe el desarrollo (Gutierrez y Gagneten, 2011).

#### **2.3.4 Níquel**

El Níquel (Ni) ocupa el lugar 24 como elemento más abundante en la corteza terrestre, que comprende aproximadamente el 3% de la composición de la tierra, es el 5to elemento más abundante en peso después del hierro, oxígeno, magnesio y silicio, puede existir en diversas formas minerales (Cempel y Nikel, 2005). El Ni es un metal blanco plateado, es un metal de transición del grupo II duro y dúctil, está presente con mayor frecuencia en combinación con azufre y hierro (Das, *et al.*, 2008). Tiene importancia industrial y comercial, es usado comúnmente para galvanoplastia inoxidable, para fabricar acero y otras aleaciones de alta resistencia a la corrosión y temperaturas (Yu, 2001; Wright y Welbourn, 2002). El Ni y sus aleaciones se utilizan ampliamente en la industria metalúrgica, química y en las industrias de procesamiento de alimentos, especialmente como catalizadores y pigmentos. El cloruro de níquel, sulfato, nitrato, carbonato, hidróxido, acetato y óxido son las sales que tienen mayor importancia comercial (Cempel y Nikel, 2005).

La contaminación ambiental por Ni ocurre por fuentes naturales como la actividad volcánica, brisa marina, polvo del suelo e incendios forestales y fuentes antropogénicas como la minería, la fundición, y el refinamiento de Ni (Yu, 2001). EL Ni está ampliamente distribuido en el ambiente, se encuentra en el aire, agua suelo y material biológico. En los ecosistemas acuáticos la principal fuente de Ni y otros metales traza son los efluentes de desechos domésticos. (Cempel y Nikel, 2005).

El Ni juega un papel esencial en la síntesis de glóbulos rojos, sin embargo, llega ser tóxico cuándo se toma en dosis altas; cantidades traza de Ni no dañan a las células, pero exponerse por largo tiempo puede causar daño celular, disminuir el peso corporal y dañar el hígado y el corazón; el envenenamiento por Ni puede causar reducción en el crecimiento celular, cáncer y daño al sistema nervioso (Sharma, 2015). En mamíferos, incluyendo humanos, la ruta primaria para la absorción de Ni es por inhalación; una pequeña cantidad es por ingestión con comida y agua, pero la mayoría es eliminada en las heces; en los organismos acuáticos, la absorción del Ni está influenciada por la dureza del agua, la toxicidad del Ni disminuye con el incremento de la dureza del agua; las sales de Ni solubles en agua pueden entrar al organismo por simple difusión o a través de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  y se acumula en el citosol de las células hasta que llegan a un equilibrio con la concentración de Ni externa o saturar los sitios de unión de la membrana; en invertebrados puede tener efectos crónicos como la inhibición del crecimiento y la reproducción (Wright y Welbourn, 2002). En cladóceros se ha detectado que la presencia y distribución de Ni en los fluidos corporales, caparazón, apéndices filtradores y huevos esto se debe principalmente a procesos de acumulación a partir del medio. A nivel celular, el efecto tóxico más claro se refleja en la homeostasis del  $\text{Mg}^{2+}$  (Gutierrez y Gagneten, 2011).

Muchos de los efectos adversos del níquel son debido a la interferencia con metales esenciales como Fe, Mn, Ca, Zn, Cu o Mg, modificándose los efectos tóxicos y cancerígenos del níquel. La toxicidad del níquel probablemente sea por su capacidad de reemplazar a otros iones metálicos en enzimas y proteínas o para unirse a compuestos celulares que contienen átomos de O, S y N, como enzimas y ácidos nucleicos, que luego se inhiben (Coogan *et al.*, 1989).

### **2.3.5 Zinc**

El Zinc (Zn) se encuentra ampliamente en la naturaleza y constituye el 0.02% en peso de la corteza terrestre. El zinc normalmente es gris opaco debido al recubrimiento con un óxido o carbonato básico (Simon-Hettich *et al.*, 2001), Zn metálico puro es raramente encontrado en la naturaleza, porque el elemento es altamente reactivo y forma una variedad de sales; la mayoría de sus compuestos son solubles al agua, aunque el metal por sí mismo no lo es; debido a su alta reactividad, el Zn es comúnmente usado como revestimiento del

acero (galvanizado); el acero es de esta forma protegido de agentes corrosivos que atacan preferencialmente la cubierta de Zn; también, por muchos siglos, el Zn ha sido aleado con cobre para hacer bronce; el mineral más común de Zn es la esfalerita (ZnS) (U. S. EPA, 1992). El Zn tiene el número atómico de 30 y la masa atómica relativa de 65.38, su valencia en compuestos químicos es +2 (Simon-Hettich *et al.*, 2001).

La fuente antropogénica más importante de Zn en el medio ambiente comprende electro-galvanizadores, fundiciones y procesos mineros, drenaje de minas, aguas residuales domésticas e industriales, escorrentía superficial de caminos, corrosión de aleaciones de Zn y superficies galvanizadas y erosión de suelos agrícolas (Eisler, 1993).

El Zn es un metal traza esencial desde el punto de vista nutricional, y una deficiencia da por resultado consecuencias graves para la salud; en otro extremo, la exposición excesiva al Zn es relativamente rara y requiere de exposición intensa; el Zn es omnipresente en el ambiente y en consecuencia se encuentra en casi todos los productos alimenticios, agua y aire; los mariscos, carnes, granos integrales, productos lácteos, nueces y legumbres tienen un alto contenido en Zn (Klaassen y Watkins, 2001)

El Zn en aguas naturales ocurre en forma de partículas disueltas o suspendidas. Sólo la fracción disuelta se cree que es tóxica para los peces; el Zn disuelto asume varias formas químicas diferentes en varios complejos orgánicos e inorgánicos; el Zn se presenta como  $Zn^{+2}$  en aguas ácidas y como ZnOH en aguas blandas; el agua blanda por otra parte incrementa la toxicidad del Zn en peces y los criterios de calidad de agua están basados en aguas duras. (U. S. EPA, 1992).

Los estudios sobre los efectos del Zinc a nivel celular indican que puede alterar el balance de  $Ca^{2+}$ , y si esto ocurre, los daños embrionarios, en el desarrollo o el crecimiento podrían ser irreversibles, con graves consecuencias poblacionales. A nivel reproductivo, la toxicidad actuaría inhibiendo la eclosión de los huevos en la cámara incubatriz, debido a la disminución de la fecundidad de las hembras (Gutierrez y Gagnetten, 2011).

## 2.4 Rutas de Ingreso de los metales

Los metales ingresan a los organismos acuáticos principalmente con la comida (Bury *et al.*, 2003), la absorción a través del agua también juega un papel importante, especialmente si los micronutrientes son deficientes en los alimentos mientras que las concentraciones de metales en el agua son altas (Golovanova, 2006). En los invertebrados acuáticos también los metales ingresan a través de la cutícula (Robinson *et al.*, 2003). La absorción de los metales depende del comportamiento en la alimentación, el ciclo de vida, el tamaño del cuerpo del animal y la duración de la exposición (Gerhardt, 1993, Timmermans *et al.*, 1992), por ejemplo, en algunos artrópodos depredadores, los metales ingresan al organismo predominantemente con los alimentos (Barata *et al.*, 2002), mientras que en organismos filtradores proviene principalmente del agua (Canli, 2005).

Los metales entran en el metabolismo celular después de fluir hacia una célula y adherirse a la membrana. Los iones metálicos entran en una célula por simple difusión o por interacción con proteínas de transporte y canales iónicos en la membrana plasmática. Luego los metales se distribuyen sobre todas las fracciones subcelulares. En el citoplasma, los iones metálicos libres interactúan con ligandos de alto peso molecular (enzimas metálicas) o de bajo peso molecular (metalotioneínas, glutatión) o se depositan en lisosomas o gránulos de membrana, dejando la célula por exocitosis (Viarengo 1995, Bury *et al.*, 2003). La síntesis de metalotioneínas es de los mecanismos de protección más importantes que actúan cuando aumentan las concentraciones de metales en peces e invertebrados (Viarengo 1995, Golovanova, 2006).

En invertebrados acuáticos, los iones de metales como el Fe se absorben en grandes cantidades en la superficie del cuerpo y se unen a la cutícula, mientras que Cu y Zn se acumulan dentro de la célula, predominantemente en el citosol. Cu y Zn ingresan a través de las membranas celulares de los invertebrados mediante la transferencia activa de los transportadores (Golovanova, 2006).

### 3. Justificación

La distribución de los metales en los ecosistemas acuáticos ha sido ampliamente documentada desde mediados de la década de 1950. Las aguas naturales en particular estuarios y sistemas de agua dulce en la actualidad no solo están siendo contaminadas en diferentes grados, sino también presentan contaminación por metales depositados en los sedimentos de actividades humanas pasadas (Rai, 2008). El nivel de contaminación por metales en el ecosistema acuático, es bajo en océanos abiertos y aumenta significativamente conforme se acerca a aguas costeras y estuarios (Bryan and Langston, 1992), en ríos y lagos se refleja la influencia antropogénica en las elevadas concentraciones presentes (Rai, 2008).

Se ha establecido la presencia de los metales Cu, Fe, Hg, Ni y Zn a nivel mundial y local en concentraciones que sobrepasan los niveles máximos permisibles por las Normas de Calidad del Agua para la Protección de Organismos Acuáticos, por lo que es importante conocer los efectos de toxicidad agudo y crónico de estos metales sobre las especies planctónicas, debido a que la contaminación por metales afecta adversamente la biodiversidad acuática, algunos metales pueden bioacumularse en los organismos, magnificarse en las cadenas alimenticias y llegar a ser una amenaza para el hombre.

La contaminación por metales puede remediarse utilizando una variedad de tecnologías químicas, físico o biológicas. Sin embargo, son relativamente ineficientes, en su mayoría generan residuos de difícil eliminación y desde el punto de vista económico los costos son muy altos (Rai, 2008).

Este estudio nos permitirá obtener valores de toxicidad aguda y crónica, además de establecer la principal ruta de ingreso de estos metales en cuatro especies planctónicas, seleccionas por su importancia ecológica debido a que son la base de las cadenas alimenticias en los hábitats acuáticos.

## 4. Hipótesis

- Los efectos adversos (agudos y crónicos) que los metales pesados Cu, Fe, Hg, Ni y Zn, tienen sobre cuatro organismos planctónicos: el alga verde *Nannochloropsis oculata* Hibberd, 1981, el ciliado *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1834, el rotífero *Euchlanis dilatata* Ehrenberg, 1832 y el cladóceros *Moina macrocopa* Straus, 1820, se presentarán de forma diferente debido a que estas especies son de diferente nivel trófico y diferente nicho ecológico.
- Debido a las propiedades físicas y químicas de los metales Cu, Fe, Hg, Ni y Zn, y a las características fisiológicas de los organismos prueba las rutas de acumulación serán diferentes para los cuatro organismos planctónicos.
- El Hg no tiene una función biológica conocida por lo que debe tener un mayor efecto agudo y crónico sobre las especies planctónicas, que los metales traza como el Cu, Ni, Fe, y Zn.

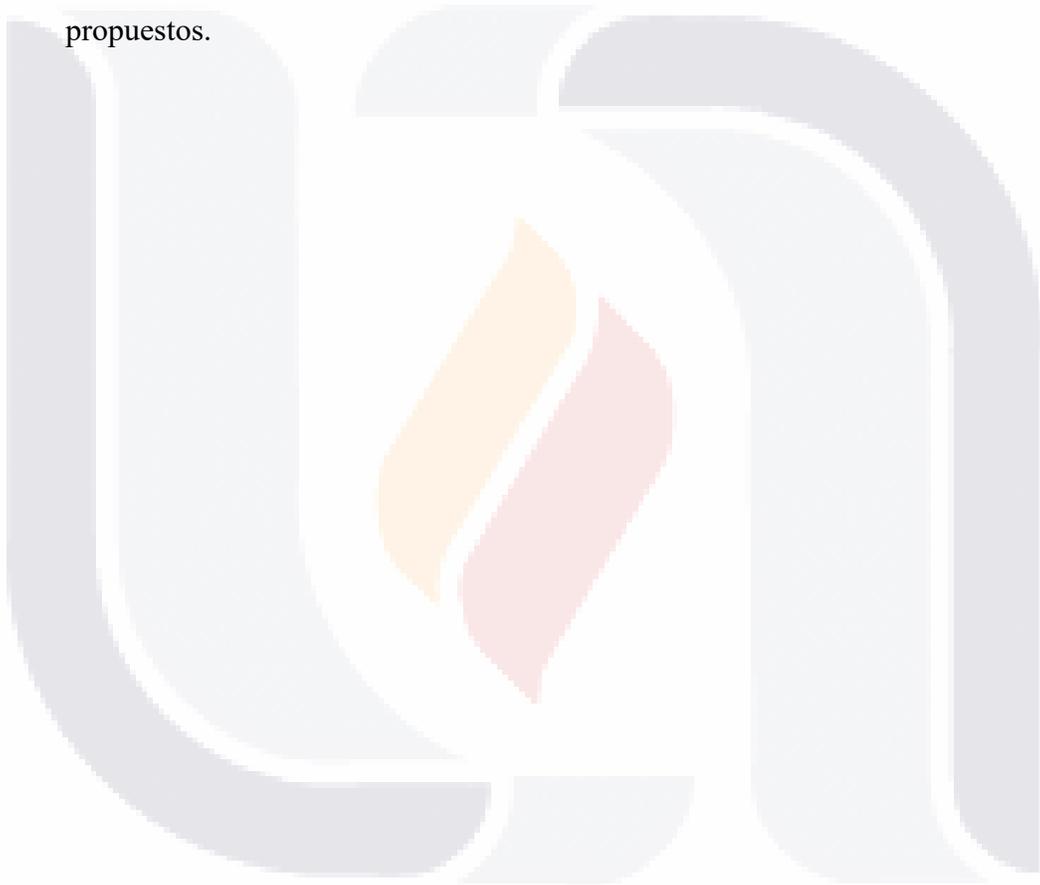
## 5. Objetivo General

Evaluar la toxicidad aguda y crónica de los metales Cu, Fe, Hg, Ni y Zn en cuatro organismos planctónicos. Estudiar las rutas de acceso y acumulación de cada metal en los organismos modelos (*N. oculata*, *P. caudatum*, *E. dilatata* y *M. macrocopa*) y cuantificar su probable bioacumulación.

### 5.1 Objetivos Particulares

- Evaluar la toxicidad aguda de los metales Cu, Fe, Hg, Ni y Zn y obtener los valores de CL50 (Concentración Letal Media), CNOE (Concentración donde no se observa efecto, en inglés No observed effect concentration NOEC) y CMOE (Concentración Mínima donde se observa efecto, en inglés Lowest observed effect concentration LOEC) en cuatro especies planctónicas.

- Determinar los valores de CE50 (Concentración donde se observa una reducción del 50% en el parámetro analizado), CNOE y CMOE de los metales Cu, Fe, Hg, Ni y Zn por medio de pruebas crónicas en cuatro especies planctónicas.
- Estudiar las rutas de ingreso de los metales Cu, Fe, Hg, Ni y Zn en los diferentes organismos planctónicos a través de fluorescencia con el reactivo Phen Green a diferentes tiempos de exposición.
- Estudiar la acumulación de los metales Cu, Fe, Hg, Ni y Zn en los organismos propuestos.



## 6. Materiales y Métodos

### 6.1. Cultivo de Organismos Prueba

El alga verde *N. oculata* fue obtenida de la colección UTEX (strain LB2194) y cultivada en Medio Basal Bold (Nichols, 1973). El rotífero *E. dilatata* y el ciliado *P. caudatum* fueron colectados en la Universidad Autónoma de Aguascalientes (21°44'13.7'' N, 102°21'3.3'' W). El cladócero *M. macrocopa* se obtuvo de quistes colectados de sedimentos de Rincón de Romos, Aguascalientes (22°17'06.00''N, 102°17'31.20''W). Los cultivos de estos organismos fueron mantenidos en cajas Petri con medio EPA (96 mg NaHCO<sub>3</sub>, 60 mg CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 60 mg MgSO<sub>4</sub> y 4 mg KCl por litro, US EPA 2002, el cual es agua moderadamente dura, 80-100 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, pH 7.5, preparado con agua desionizada Water Pro System Labconco Co., Kansas City, USA), a una temperatura de 25 ± 2 °C y un fotoperiodo de 16:8 h de luz:oscuridad en una cámara bioclimática (Revco Scientific, Asheville, NC, USA).

El rotífero *E. dilatata* fue alimentado con *N. oculata* (1 x 10<sup>6</sup> células/ml). El cultivo de *M. macrocopa* fue alimentado con el alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) F.Hindák 1990 (1 x 10<sup>6</sup> células/ml, UTEX 1648). El ciliado *P. caudatum* fue cultivado en medio EPA e infusión de trigo, el cual consistió en hervir por 5 minutos 2.5 gr de trigo en un litro de agua destilada, se filtró y se le adicionó 0.5 gr de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, se esterilizó en una autoclave por 15 min a 120 °C.

### 6.2 Pruebas de Toxicidad aguda

Para la evaluación de los metales Cu, Fe, Ni y Zn se utilizaron Estándares de Adsorción Atómica (Sigma Co., USA) diluidos en 3% HNO<sub>3</sub>, para Hg se utilizó cloruro de mercurio (Sigma Co., USA). Las soluciones con las concentraciones de los metales se prepararon en medio EPA. En todas las pruebas agudas se realizaron pruebas preliminares para obtener cinco concentraciones definitivas para las pruebas de toxicidad, se realizaron cinco replicas y un control negativo y se colocaron en una cámara bioclimática a un fotoperiodo de 16:8 h, y a una temperatura de 25 ± 2 °C.

El objetivo de estas pruebas fue contar el número de organismos muertos o inmóviles, fueron pruebas estáticas de 24 h, sin alimento o renovación del medio. Las pruebas se consideraron validas solo cuando en el control negativo la mortalidad fue menor al 10 %.

### **6.2.1 Prueba aguda con *Nannochloropsis oculata***

El protocolo de la prueba con el alga *N. oculata* se realizó de acuerdo a Blaise y Vasseur (2005). Antes de iniciar la prueba, el alga fue lavada tres veces con medio EPA para evitar alguna posible interferencia de los metales traza que contiene el medio de cultivo. La densidad de alga usada para la prueba fue de  $5 \times 10^5$  células/mL. Las pruebas se realizaron en placas de poliestireno de 24 pozas de 3mL (Corning Co. USA). Los rangos de concentraciones nominales utilizadas para cada metal fueron: 10, 50, 100, 500, 1000  $\mu\text{g/L}$ , 1000, 7000, 14000, 21000, 28000  $\mu\text{g/L}$ , 10, 250, 500, 750, 1000  $\mu\text{g/L}$ , 150, 750, 1500, 7500, 15000  $\mu\text{g/L}$ , y 100, 4000, 8000, 11000, 15000  $\mu\text{g/L}$  para Cu, Fe, Hg, Ni y Zn respectivamente. La concentración de alga y tóxico se llevaron a un volumen total de 1 ml con medio EPA, después de 24 horas se midió la fluorescencia con un fluorómetro de placa (Modulos<sup>TM</sup> II Microplate, Turner Biosystems) con un rango máximo de excitación de 490 nm y una longitud de onda de emisión de 510-571 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento con la siguiente formula:

$$\%I = \left( \frac{Fc - Ft}{Fc} \right) 100$$

Donde:

$\%I$  = Porcentaje de Inhibición,

$Fc$  = Unidades de Fluorescencia en el control,

$Ft$  = Unidades de Fluorescencia en el tratamiento.

### **6.2.2 Prueba aguda con *Euchlanis dilatata***

Las pruebas con *E. dilatata* se realizaron siguiendo el protocolo desarrollado por Arias-Almeida y Rico-Martínez (2011) con ligeras modificaciones. La prueba inicio separando huevos partenogénicos de hembras asexuales ovígeras 24 horas antes de las pruebas y se incubaron a 25 °C. Al día siguiente se tomaron los neonatos de menos de

24 horas y se colocaron 10 organismos en pozas de 3 mL (placas de 24 pozas de poliestireno, Corning Co. USA). Los rangos de concentraciones nominales utilizados para cada metal fueron: 1, 3, 10, 30, 60  $\mu\text{g/L}$  para Cu, 100, 1000, 2000, 3000, 4000  $\mu\text{g/L}$  para Fe, 1, 3, 6, 9, 15  $\mu\text{g/L}$  para Hg, 10, 100, 1000, 1500, 2000  $\mu\text{g/L}$  para Ni y 10, 50, 100, 450, 600  $\mu\text{g/L}$  para Zn. Cada poza tuvo un volumen total de 1 mL. La mortalidad se registró como organismos inmobilizados o sin movimiento después de la estimulación mecánica durante 10 segundos.

### **6.2.3 Prueba de aguda con *Paramecium caudatum***

Las pruebas se realizaron siguiendo el protocolo descrito por El-Bassat *et al.* (2012) con pequeñas modificaciones. La prueba inició lavando los organismos con medio EPA para quitar el exceso del medio de cultivo, se colocaron 10 organismos por poza en una placa de 24 pozas de poliestireno (Corning Co. USA). Los rangos de concentraciones nominales utilizadas para cada metal fueron: 10, 11, 12, 14, 16  $\mu\text{g/L}$  para Cu, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000  $\mu\text{g/L}$  para Fe, 1, 5, 7, 10, 25  $\mu\text{g/L}$  para Hg, 300, 400, 500, 600, 700  $\mu\text{g/L}$  para Ni, y 500, 750, 1000, 1250, 2000  $\mu\text{g/L}$  para Zn. Cada poza se llevó a un volumen final de 1 mililitro.

### **6.2.4 Prueba aguda con *Moina macrocopa***

Las pruebas se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo de la U. S. EPA (2002), con ligeras modificaciones. La prueba inició con la separación de hembras que presentaban huevos, al día siguiente se colectaron los neonatos de menos de 24 h y se colocaron en un frasco con medio EPA, esto se hace al menos una hora antes de la prueba. Posteriormente se colocan 5 organismos en frascos de 30 ml. Los rangos de concentraciones nominales utilizadas para los metales fueron: 30, 37.50, 45, 52.50, 60  $\mu\text{g/L}$ , 2600, 3000, 3400, 3800, 4200  $\mu\text{g/L}$ , 1, 5, 7.5, 25, 50  $\mu\text{g/L}$ , 3000, 3500, 4000, 4500, 5000  $\mu\text{g/L}$ , y 600, 1200, 1800, 2400, 3000  $\mu\text{g/L}$  para Cu, Fe, Hg, Ni y Zn respectivamente. Cada frasco se llevó a un volumen total de 15 ml.

### 6.2.5 Media Geométrica

Se calculó la Media Geométrica con los valores de CL50 para obtener el metal que fue más tóxico para el grupo. La Media Geométrica es la raíz N-ésima del producto de los  $N$  elementos, la fórmula para calcularla es la siguiente:

$$\sqrt[N]{X_1 \cdot X_2 \cdot \dots \cdot X_n}$$

### 6.3 Pruebas de Toxicidad Crónica

Para la evaluación de los metales Cu, Fe, Ni y Zn se utilizaron Estándares de Adsorción Atómica (Sigma Co., USA) diluidos en 3% HNO<sub>3</sub>, para Hg se utilizó cloruro de mercurio (Sigma Co., USA). Las soluciones con las concentraciones de los metales se prepararon en medio EPA.

Para todas las pruebas crónicas se realizaron pruebas preliminares para obtener cinco concentraciones definitivas para las pruebas de toxicidad, se realizaron con cinco replicas y un control negativo y se colocaron en una cámara bioclimática a un fotoperiodo de 16:8 h, y a una temperatura de 25 ± 2 °C.

#### 6.3.1 Prueba crónica con *Nannochloropsis oculata*. Inhibición del crecimiento

En esta prueba se siguió el mismo protocolo que para la prueba aguda con la diferencia en el tiempo de incubación a 96 h (Blaise y Vasseur 2005). Los rangos de concentraciones nominales utilizados para esta prueba con cada metal fueron: 5, 25, 50, 100, 150 µg/L, 700, 1400, 3000, 5000, 7000 µg/L, 60, 75, 100, 200, 300µg/L, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 µg/L y 50, 1500, 3000, 4500, 6000 µg/L para Cu, Fe, Hg, Ni y Zn respectivamente.

#### 6.3.2 Prueba Crónica con *Euchlanis dilatata*. "r" Tasa Intrínseca de Crecimiento

Para esta prueba se siguió el protocolo para la prueba crónica de *Lecane quadridentata* de 5-d (Hernández-Flores y Rico-Martínez, 2006). La prueba con *E. dilatata* inició separando huevos 24 h antes de las pruebas y se incuban a 25°C, al día siguiente se

tomaron los neonatos de menos de 24 h y se colocaron 5 organismos por poza (las pruebas se realizaron en placas de poliestireno de 24 pozas de 3mL Corning Co. USA). Los rangos de concentraciones nominales utilizados para cada metal fueron: 3, 4, 5, 6, 7 µg/L para Cu, 1000, 2000, 2500, 3000, 3500 µg/L para Fe, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 µg/L para Hg, 10, 50,100, 150, 200 µg/L para Ni y 50, 100,150, 200, 150 µg/L para Zn. Cada poza se llevó a un volumen total de 2 ml. Al inicio de la prueba se agregó una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL de *N. oculata*. Se incubaron durante 5 días. Al final de la incubación se contó el número de organismos con la ayuda de un microscopio estereoscópico y se calculó “*r*” (Tasa de Intrínseca de Crecimiento) usando la siguiente formula:

$$r = \ln (Nt - N0) / t$$

Donde:

*r* = tasa intrínseca de crecimiento,

*ln* = logaritmo natural,

*Nt* = número de rotíferos en la poza después de 5 días,

*N0* = número inicial de rotíferos y

*t* = tiempo (5 días).

### 6.3.3 Prueba Crónica con *Paramecium caudatum*. Inhibición del crecimiento

Las pruebas se realizaron siguiendo el protocolo de Miyoshi *et al.*, 2003 con ligeras modificaciones. La prueba comenzó colocando 5 organismos en pozas de placas de poliestireno de 24 pozas de 3 mL (Corning Co. USA). Los rangos de concentraciones nominales utilizados para cada metal fueron: 40, 60, 80, 100, 120 µg/L para Cu, 750, 1250, 1750, 2250, 2750 µg/L para Fe, no hubo rango para Hg, 10, 50, 100, 150, 200 µg/L para Ni, y 300, 475, 650, 825, 1000 µg/L para Zn. El volumen final en la poza fue de 2 mL. Se incubaron por en una cámara bioclimática con un fotoperiodo de 16:8 a 25 °C por 96 h. Al finalizar el tiempo de exposición se contó el número de organismos en cada poza para obtener el porcentaje de inhibición de la población aplicando la siguiente formula:

$$\%I = \left( \frac{Nc - Nt}{Nc} \right) 100$$

Donde:

$%I$  = % de Inhibición

$N_c$  = es el número total de organismos vivos después de 96 h en el control

$N_t$  = es el número total de organismos vivos después de 96 h en el tratamiento

#### **6.3.4 Prueba Crónica *Moina macrocopa* ("r") Tasa intrínseca de crecimiento**

La prueba se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de U. S. EPA (2002) con ligeras modificaciones. La prueba inició con la separación de hembras que presentaban huevos partenogénéticos, al día siguiente se colectaron los neonatos de menos de 24 h y se colocaron en un frasco con medio EPA, esto se hizo al menos una hora antes de la prueba. Posteriormente se colocaron 5 organismos en un frasco de 30 ml. Los rangos de concentraciones nominales utilizados para cada metal fueron: 10, 15, 20, 25, 35  $\mu\text{g/L}$ , 10, 500, 1000, 1500, 2000  $\mu\text{g/L}$ , 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16  $\mu\text{g/L}$ , 30, 60, 120, 240, 480  $\mu\text{g/L}$ , y 6.8, 13.6, 34, 64, 68  $\mu\text{g/L}$  para Cu, Fe, Hg, Ni, Zn respectivamente. Cada frasco tuvo un volumen total de 15 ml. Se alimentaron diariamente con una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml de *N. oculata*. Los neonatos se incubaron durante 7 días. Al término de la prueba se contó el número total de organismos en cada tratamiento con ayuda de un microscopio estereoscópico y se calculó "r".

#### **6.3.5 Prueba Crónica *Euchlanis dilatata* Inhibición de la ingestión**

Se utilizó el protocolo de Juchelka y Snell (1994) con ligeras modificaciones. El protocolo consiste en medir la Inhibición tasa de la Ingestión al exponer al rotífero a diferentes concentraciones de metal. Los rangos de concentraciones nominales utilizados para cada metal fueron: 0.04, 0.05, 0.08, 0.16, 0.4  $\mu\text{g/L}$ , 12, 19, 28, 60, 140  $\mu\text{g/L}$ , 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12  $\mu\text{g/L}$ , 5, 7, 14, 24, 40  $\mu\text{g/L}$  y 1.1, 2.2, 4.4, 8.8, 11  $\mu\text{g/L}$  para Cu, Fe, Hg, Ni y Zn respectivamente. Se usaron microesferas de poliestireno fluorescentes de 4.18  $\mu\text{m}$  de diámetro (Dragon Green, Bangs Laboratories Inc., USA). La prueba comenzó colocando 30 neonatos de *E. dilatata* de menos de 24 h en placas de poliestireno de 24 pozas de 3 mL (Corning Co. USA). La concentración de metal se llevó a un volumen de 1 mL. Los neonatos fueron incubados en una cámara bioclimática por 1h a 25 °C después de este tiempo se agregó  $4.5 \times 10^5$  microesferas/mL, agitándose ligeramente y se incubó por 30min

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

más en oscuridad a 25 °C. La ingestión fue interrumpida adicionado 100 µL de formol al 10%. Los organismos fueron lavados 3 veces para eliminar las esferas en solución, los organismos se colocaron en el centro de un portaobjetos con cintas masking tape a los extremos para que el cubreobjetos no aplastara a los organismos, después se observaron con un microscopio de fluorescencia (espectro de excitación de 450 a 490 nm y con una barrera de emisión de 515 nm) con una cámara DC100 (Leica Co., German) acoplada a un programa de análisis de imagen (Kodak Co.,USA). Un total de 10 organismos de cada tratamiento fue examinado.

La Inhibición de la Tasa de Ingestión se obtuvo dibujando la forma del intestino y con la misma forma el fondo alrededor del organismo. Entonces, se obtuvo las unidades de fluorescencia restando el valor medio del área de fondo al valor medio del intestino. Se realizaron tres réplicas de cada tratamiento.

#### **6.3.6 Prueba Crónica *Paramecium caudatum* Inhibición de Formación de vacuolas**

Se utilizó el protocolo de Kryuchkova (2016) con ligeras modificaciones. La prueba consiste en medir el porcentaje de Inhibición de Vacuolas digestiva en *P. caudatum* al exponerlos a diferentes concentraciones de metal (Cu, Fe, Hg, Ni y Zn). Se usaron microesferas de poliestireno fluorescentes de 1.01 µm de diámetro (Dragon Green, Bangs Laboratories Inc., USA). La prueba comenzó colocando 50 organismos en placas de poliestireno de 96 pozas de 300 µL (Corning Co. USA). Los rangos de concentraciones nominales utilizados para cada metal fueron: 1, 3, 5, 7, 9 µg/L para Cu, 600, 900, 1200, 1500, 1800 µg/L para Fe, 1, 2.5, 4, 5.5. 7 µg/L para Hg, 100, 200, 300, 400,500 µg/L para Ni y 22, 55, 110, 550, 600 µg/L para Zn. La concentración de metal se llevó a un volumen de 200 µL. Los organismos fueron incubados en una cámara bioclimática por 1h a 25 °C después de este tiempo se agregó 1 x 10<sup>6</sup> microesferas/mL, agitándose ligeramente y se incubó por 30 min más en oscuridad a 25 °C. La ingestión fue interrumpida adicionado 40 µL glutaraldehído 2.5 %. Los organismos fueron lavados 3 veces para eliminar las esferas en solución, los organismos se colocaron en el centro de un portaobjetos con cintas masking tape a los extremos para que el cubreobjetos no aplastara a los organismos, después se observaron con un microscopio de fluorescencia (espectro de excitación de 450

a 490 nm y con una barrera de emisión de 515 nm) con una cámara DC100 (Leica Co., German) acoplada a un programa de análisis de imagen (Kodak Co.,USA). Un total de 30 organismos de cada tratamiento fue examinado.

#### 6.4 ACR

Se calculó la Relación Toxicidad Aguda a Crónica (ACR), para analizar los resultados de las pruebas crónicas de *E. dilatata* y *P. caudatum*. Se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$ACR = CL50/MATC_{crónico}$$

MATC (Maximum Acceptable Toxicant Concentration, en español CTMA Concentración Tóxica Máxima Aceptable). El MATC es la media geométrica entre la Concentración de Efecto No Observado (NOEC) y la Concentración Mínima donde se observa efecto (LOEC) y se calcula:

$$MATC = \sqrt{(NOEC)(LOEC)}$$

#### 6.5 Determinación de la Biomasa.

Mil hembras adultas no-ovígeras de *E. dilatata* ( $n=5$ ), se separaron se colocaron en una placa Petri. Antes de pesarse, cada muestra fue lavada cuidadosamente con agua destilada y colocadas en una placa de pesaje usando una pipeta. Las muestras se secaron a 60 °C por 24 h en una estufa Fisher Scientific, Isotemp® Serie 500, se dejaron enfriar a temperatura ambiente (25 °C) en un desecador y pesada en una balanza analítica (Chyo JK-200, rango: 0.1 mg a 200 g) para determinar el peso seco. El peso seco se obtuvo dividiendo el número de organismos de la muestra para calcular el peso seco individual promedio. El peso seco de cada organismo se usó para calcular la carga corporal de metal ( $\mu\text{g}/\text{individuo}$ ) y la concentración de metal por unidad de peso corporal ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ) (Waykar y Shinde 2011). Se calculó la Carga corporal de metal (Lethal Body Burden LBB) y la Carga Corporal Crónica (CBB) con las siguientes fórmulas:  $LBB = CL50 \times FBC$  (Factor de Bioconcentración) y  $CBB = CE50 \times BCF$  (McCarty 1986).

Para la determinación de la biomasa con *P. caudatum* se separaron cinco mil organismos.

## 6.6 Determinación de la Bioconcentración de metal por ensayo fluorométrico usando

### Phen Green

El fluoróforo Phen Green™ SK (PG) diacetato fue comprado a Molecular Probes. El sustrato fue preparado de la siguiente manera: 1 mg de PG fue disuelto en 1 ml de DMSO, de este stock fueron preparadas alícuotas de 5 µL de PG y 495 µL de agua destilada, se almacenaron a 4 °C en oscuridad hasta su uso. El PG muestra máximos de excitación/emisión de 507/532 nm, respectivamente y la fluorescencia se extingue al interaccionar con los iones metálicos (Petrat *et al.*, 1999; Shingles *et al.*, 2004 Illing *et al.*, 2012).

### 6.6.1 *Euchlanis dilatata*

La prueba comenzó colocando 20 organismos en una placa de 24 pozas (Corning Co. USA), se adicionó 1 mL de solución con metal o control negativo. La concentración de sustrato en cada poza fue de 71.5 nM. Se evaluaron 2 tiempos de incubación 30 min y 1 h, los organismos expuestos al metal fueron incubados a 25 °C en oscuridad, entonces los organismos fueron lavados con medio EPA para remover el metal y se transfirieron a otra placa con 1 mL de solución sin metal, entonces se adicionó 5 µL de PG e incubados a 25 °C por 15 min (Petrat *et al.*, 1999). Al terminar el tiempo de incubación se agregaron 50 µL de formalina al 5 %. La fluorescencia fue registrada de la misma manera que en la prueba de Inhibición de Ingestión.

### 6.6.2 *Paramecium caudatum*

La prueba comenzó colocando 50 organismos en una placa de 96 pozas (Corning Co. USA), se adicionó 200 µL de solución con metal o control negativo. La concentración de sustrato en cada poza fue de 71.5 nM. Se evaluaron 2 tiempos de incubación 1 h y 24 h, los organismos expuestos al metal fueron incubados a 25 °C en oscuridad, entonces los organismos fueron lavados con medio EPA para remover el metal y se transfirieron a otra placa con 200 µL de solución sin metal, entonces se adicionó 2 µL de PG e incubados a 25 °C por 15 min (Petrat *et al.*, 1999). Al terminar el tiempo de incubación se agregaron 50 µL de glutaraldehído al 5 %. La fluorescencia fue registrada de la misma manera que en la prueba de Inhibición de Ingestión.

## 6.7 Bioconcentración

### 6.7.1 *Euchlanis dilatata*

Mil organismos de *E. dilatata* fueron expuestos durante 24 h en ausencia de alimento para permitir la absorción del metal, en un volumen de 5 ml de solución con metal y fueron incubados a 25 °C con un fotoperiodo 16:8. Después de las 24, los rotíferos vivos fueron usados para determinar la bioconcentración de los metales en el cuerpo de acuerdo con las concentraciones usadas, se lavaron con medio EPA y se transfirieron inmediatamente a medio EPA limpio. Las muestras fueron colocadas en tubos eppendorf enjuagados con agua desionizada y HNO<sub>3</sub> Instra (70%). Cada muestra se analizó por triplicado. La cantidad acumulada (q) de metal (µg/g peso seco) fue calculado usando la fórmula de Volesky y Holand (1995) modificada por Arunakumara *et al.* (2007):

$$q = (C_0 - C_t) V/W$$

Donde:

C<sub>0</sub>, = la concentración inicial de metal en el medio (µg/L)

C<sub>t</sub> = concentración de metal en el tiempo t (µg/L)

V = volumen total de la muestra (L) y

W = peso seco de los rotíferos (g).

El factor de bioconcentración (FBC) se determinó por la proporción de metal acumulado en todo el cuerpo de *E. dilatata* y la concentración de metal en la solución.

### 6.7.2 *Paramecium caudatum*

Es el mismo protocolo que para *E. dilatata* con algunas modificaciones. Diez mil organismos de *P. caudatum* fueron expuestos durante 24 h en un volumen de 30 ml de solución con metal. Después de las 24, se lavaron con medio EPA centrifugándolos por 10 min a 10 000 rpm, las muestras fueron colocadas en tubos Falcon.

## **6.8 Distribución de sensibilidad de especies (DSE)**

Mediante el programa ETX 2.2 se realizó la DSE con los datos de toxicidad aguda y crónica obtenidos en este estudio, además de integrar valores de toxicidad de otras especies encontrados en la bibliografía. Se obtuvieron los valores de HC5 y HC50 y los límites superior e inferior para cada metal seleccionado (Van Vlaardingen *et al.*2017).

## **6.9 Determinación de concentraciones reales**

Las concentraciones reales de exposición de los metales fueron determinadas a través de Espectroscopia de Absorción Atómica, siguiendo el método analítico recomendado: Horno de Grafito para Fe, Ni y Zn (3030E), Cu fue determinado por la modalidad de Flama Aire-Acetileno (3113B) y Hg por Generador de Hidruros (3112B). Se usó un modelo Perkin-Elmer AAnalyst para todas las determinaciones.

## **6.10 Análisis Estadístico**

Todos los parámetros toxicológicos se realizaron determinado la concentración real de cada metal. Los valores de CL50 se calcularon usando una regresión lineal entre el logaritmo de las concentraciones de exposición de cada metal y las unidades Probit (conversión de los porcentajes de mortalidad) usando el software Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2004). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para las comparar las cinco concentraciones de tóxico contra el control negativo y una prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre las medias de cada concentración de metal contra el control y obtener los valores de CNOE (concentración del tóxico en la que no se observa un efecto diferente al control, traducción del valor NOEC en inglés) y CMOE (concentración mínima en donde se observa un efecto diferente al control, traducción del valor LOEC en inglés). Los valores de CE<sub>50</sub> (la concentración en la que se observa una reducción del 50 % en el efecto observado) se calcularon por medio de un análisis de regresión entre las diferentes concentraciones de metal y los valores de “r”, porcentaje de inhibición o unidades de fluorescencia.

## 7. Resultados

Las concentraciones reales de exposición aguda y crónica de los metales fueron determinadas por absorción atómica. Los valores obtenidos fueron:  $94.1 \pm 0.07 \%$ ,  $91.55 \pm 0.085 \%$ ,  $81.4 \pm 0.06 \%$ ,  $71.2 \pm 0.28 \%$ ,  $92.4 \pm 0.16 \%$  (media  $\pm$  1 DE, n = 3) de los valores nominales para Cu, Fe, Hg, Ni y Zn respectivamente.

### 7.1 Pruebas con *Nannochloropsis oculata*

#### 7.1.1 Pruebas Agudas *Nannochloropsis oculata*

Los resultados de las pruebas de toxicidad aguda para los cinco metales se muestran en el Cuadro 2. En todas las pruebas la  $CNOE < CL10 < CMOE$ . El Coeficiente de Correlación ( $R^2$ ) en todas las pruebas fue mayor a 0.76 y el Coeficiente de Variación (CV %) fue menor a 21 %. Los metales con mayor toxicidad fueron Cu y Hg (Cuadro 2) y el de menor toxicidad fue Fe (Cuadro 2). El orden de toxicidad fue  $Cu > Hg > Ni > Zn > Fe$ . En la Figura 3 se presentan las gráficas de regresión lineal de cada una de las pruebas agudas con *N. oculata* y los cinco metales.

#### 7.1.2 Pruebas Crónicas *Nannochloropsis oculata*

Los resultados de la prueba crónica de Inhibición del Crecimiento (%IC) de *N. oculata* con los 5 metales se muestran en el Cuadro 2. En todas las pruebas la  $CNOE < CL10 < CMOE$ .  $R^2$  en todas las pruebas fue mayor a 0.76 y el CV % fue menor a 21 %. El Cu fue el metal que más inhibió el crecimiento de *N. oculata*, seguido de Hg, se necesitaron concentraciones más altas de Ni, Zn, y Fe para inhibir el crecimiento de *N. oculata* (Cuadro 2). Las gráficas de regresión lineal de las pruebas de %IC de *N. oculata* se muestran en la Figura 4.

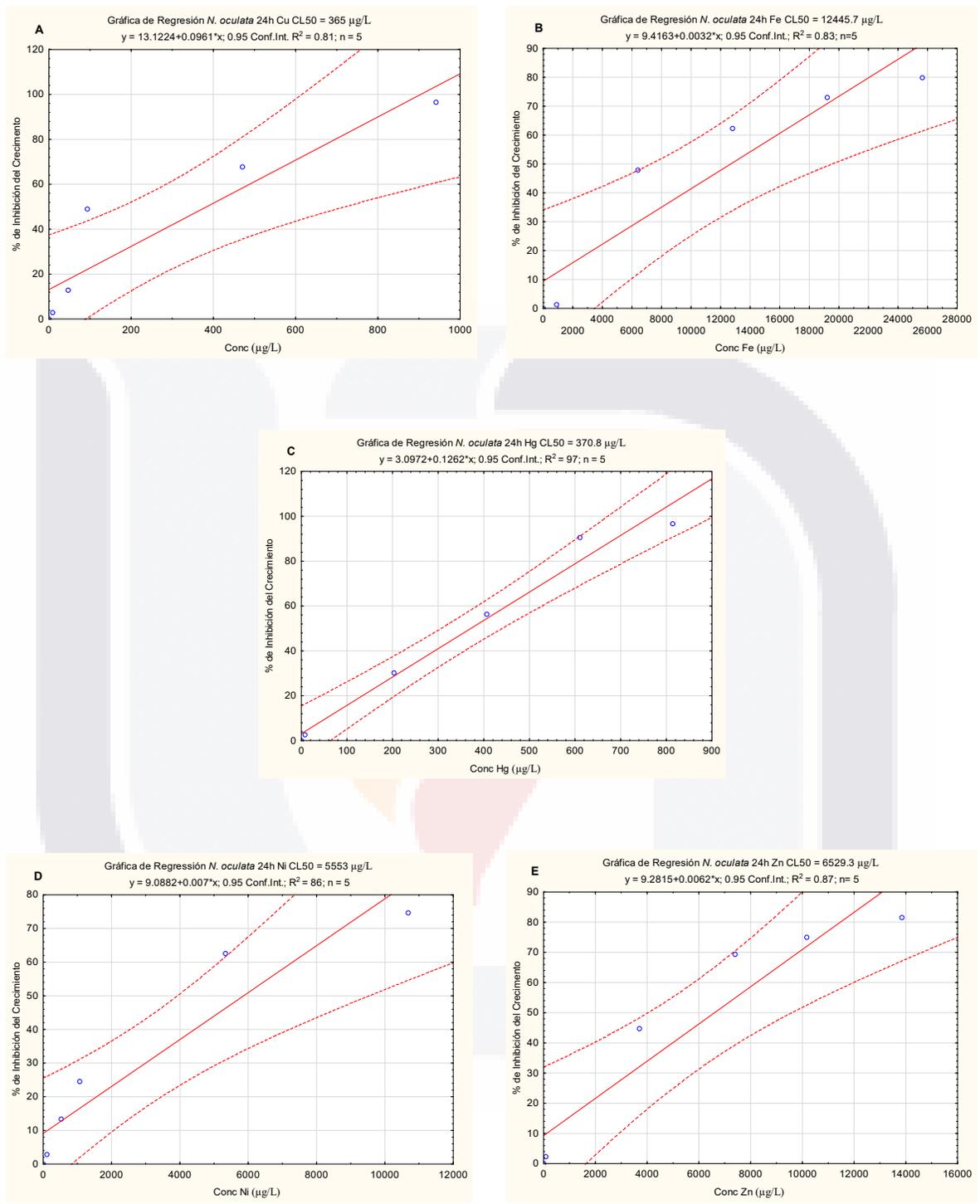
**Cuadro 2.** Resultados de las pruebas agudas y crónicas con *Nannochloropsis oculata*.

Resultados	Cu (µg/L)	Fe (µg/L)	Hg (µg/L)	Ni (µg/L)	Zn (µg/L)	
Aguda	CNOE	9.41	915.5	8.1	106.8	92.4
	CL10	12.1	1574.8	61.4	434.5	715.3
	CMOE	47	6408.5	203.5	534	3696
	CL50	365	12445.7	370.8	5553	6529.3
	LC 95%	169 – 561	7655 – 17237	306 – 435	3378 – 7729	4215 – 8843
	R <sup>2</sup>	0.81	0.83	0.97	0.86	0.87
	CV%	4.26	3.36	6.19	6.7	1.24
Crónica (%IC)	CNOE	4.70	320	24	712	46
	CE10	11.03	446	28	1127	264
	CMOE	23.52	641	49	1424	1386
	CE50	61.39	3755	132.5	2519	2867
	LC 95%	32.3 – 90.43	3166 – 4344	122.5 -143	2130 – 2908	2514 – 3221
	R <sup>2</sup>	0.8	0.96	0.99	0.95	0.98
	CV%	3.89	8.48	11.51	5.01	3.66

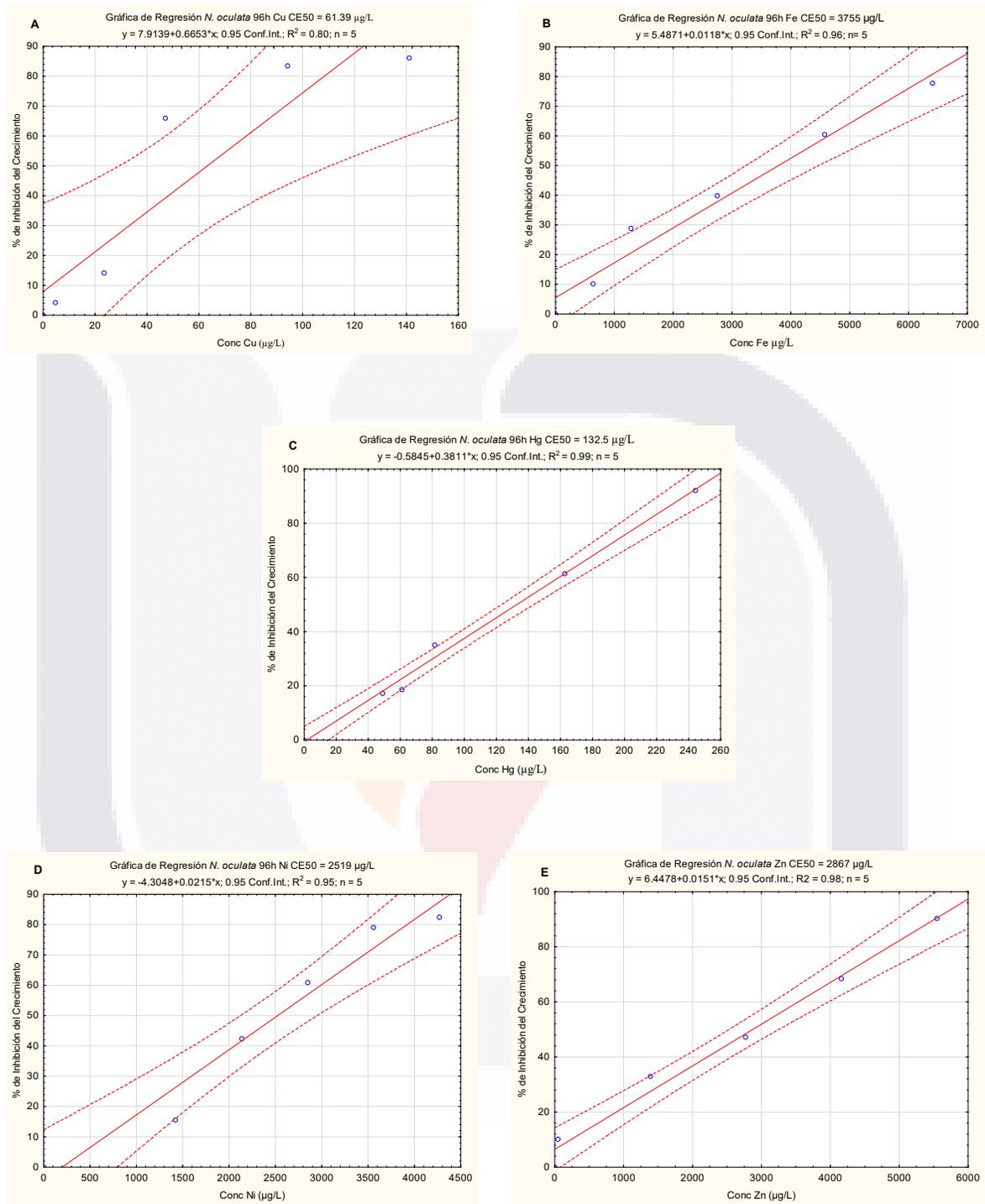
## 7.2 Pruebas con *Euchlanis dilatata*

### 7.2.1 Pruebas Agudas *Euchlanis dilatata*

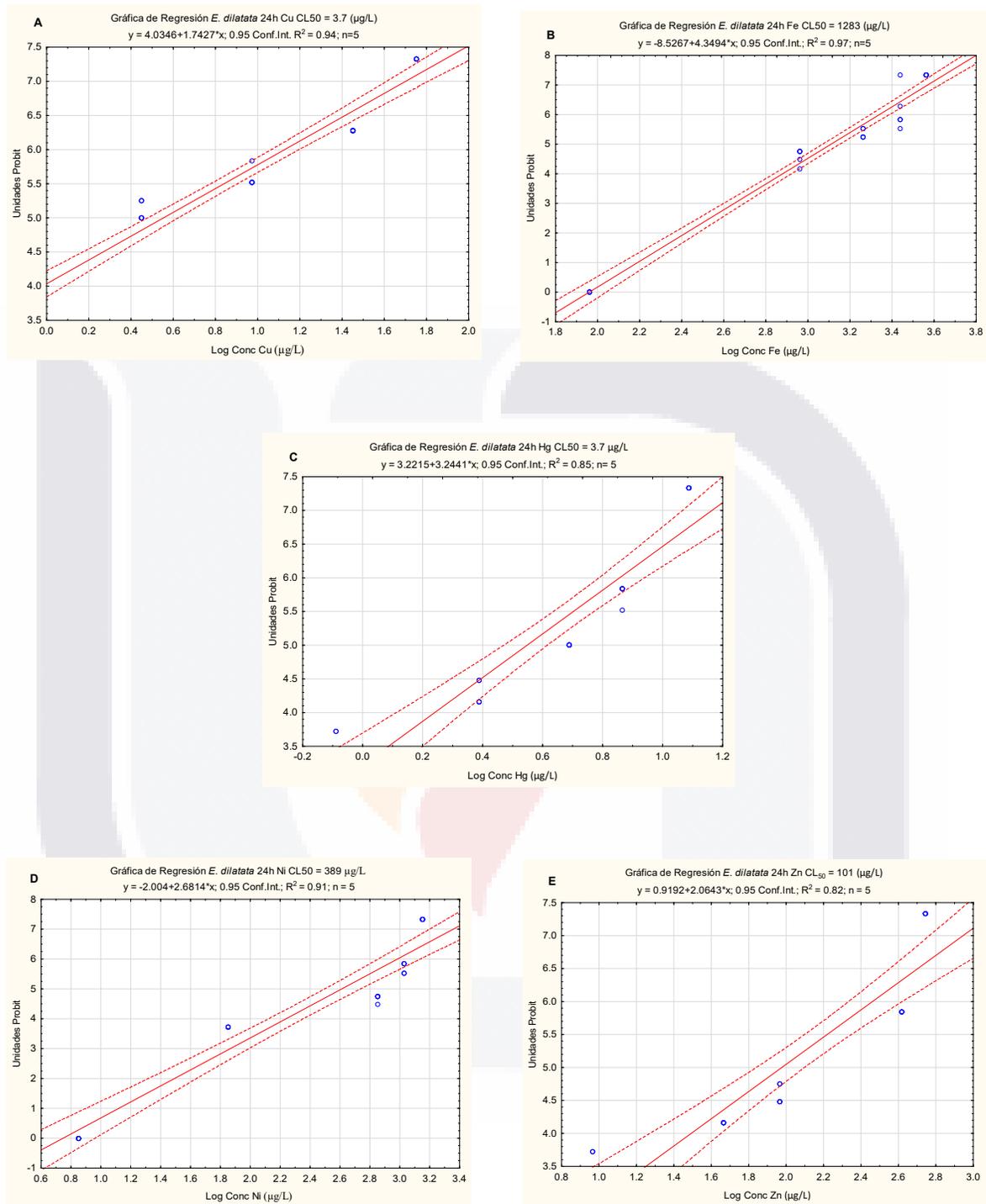
Los resultados de las pruebas de toxicidad aguda para los cinco metales se muestran en el Cuadro 3. En todas las pruebas la CNOE < CL10 < CMOE. El R<sup>2</sup> en todas las pruebas fue mayor a 0.76 y el CV% fue menor a 21 %. Los metales con mayor toxicidad fueron Cu y Hg y el de menor toxicidad fue Fe (Cuadro 3). El orden de toxicidad fue Cu = Hg > Zn > Ni > Fe. En la Figura 5 se presentan las gráficas de regresión lineal de cada una de las pruebas agudas con *E. dilatata* y los cinco metales.



**Figura. 3.** Pruebas Agudas de *Nannochloropsis oculata*. Gráficas de regresión lineal entre % de Inhibición del Crecimiento de *Nannochloropsis oculata* y la concentración del metal. A) Cu, B) Fe, C) Hg, D) Ni y E) Zn.



**Figura. 4.** Pruebas Crónicas de Inhibición del Crecimiento de *Nannochloropsis oculata*. Gráficas de regresión lineal entre % de Inhibición de Crecimiento de *Nannochloropsis oculata* y la concentración del metal. A) Cu, B) Fe, C) Hg, D) Ni y E) Zn.



**Figura. 5.** Pruebas Agudas de *Euchlanis dilatata*. Gráficas de regresión lineal entre la mortalidad en Unidades Probit de *Euchlanis dilatata* y el Log de la concentración del metal. A) Cu, B) Fe, C) Hg, D) Ni y E) Zn.

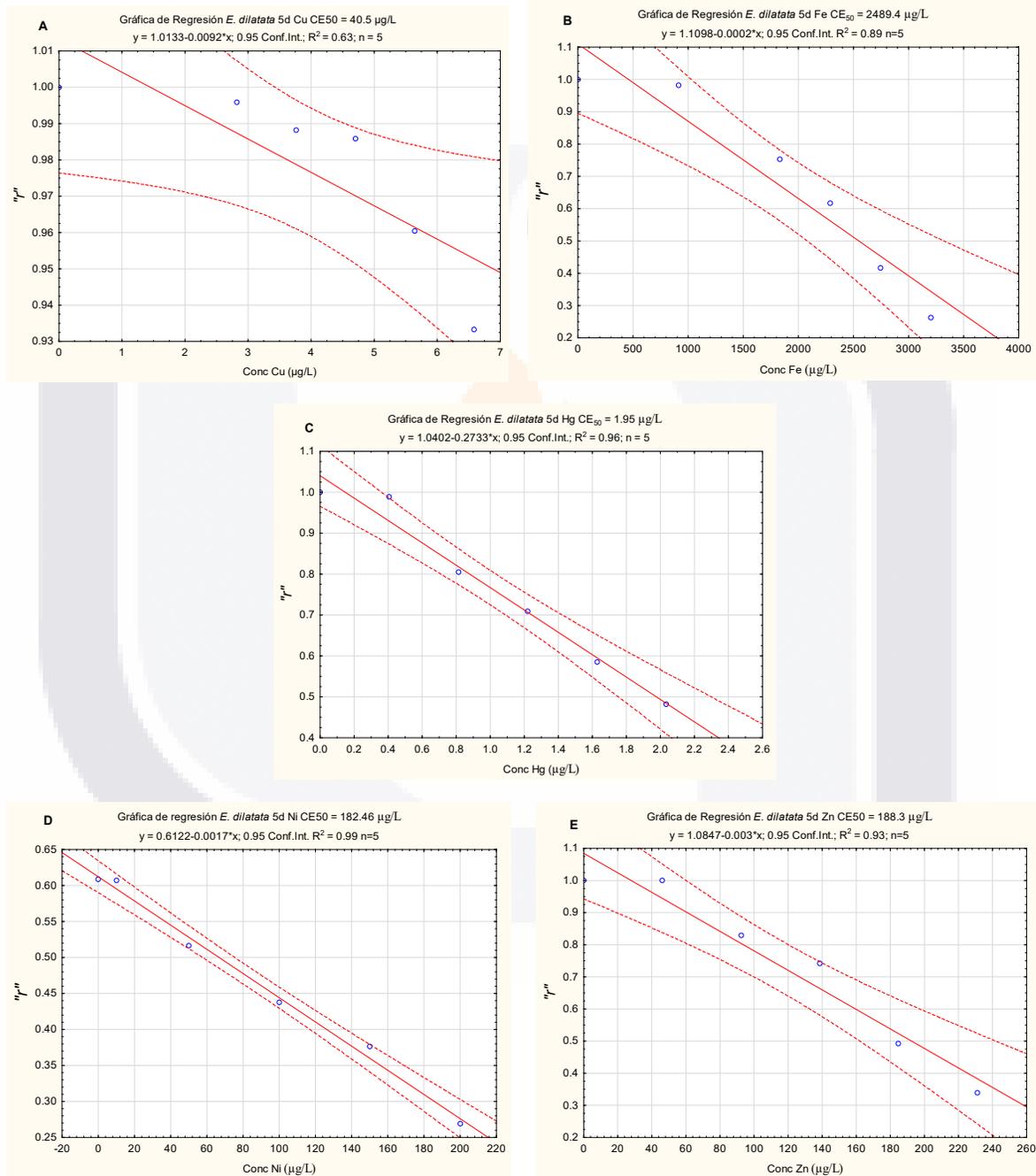
### 7.2.2 Pruebas Crónicas *Euchlanis dilatata*

En el Cuadro 3 se muestran los parámetros calculados para las pruebas crónicas que miden la Tasa Intrínseca de Crecimiento (“*r*”) y la prueba de Inhibición de la Ingestión (IIng) de *E. dilatata*. En todas las pruebas la CNOE < CL10 < CMOE. EL R<sup>2</sup> fue mayor a 0.76 en las pruebas a excepción de la prueba de “*r*” con Cu que fue de 0.63 y el CV% fue menor a 21 %. El Hg fue el metal que más afecto “*r*” con una CE50 = 1.95 µg/L y el Fe requirió altas concentraciones para afectar “*r*” (Cuadro 3), estos valores tienen un factor superior a 1000. En la prueba de IIng también Hg fue el metal que más afecto la ingestión (Cuadro 3) seguido de Cu y también se requirió concentraciones más altas de Fe (Cuadro 3) para afectar la ingestión, pero al comparar las CE50 de “*r*” y las CE50 de IIng, se encontró que las CE50 de IIng fueron más sensibles.

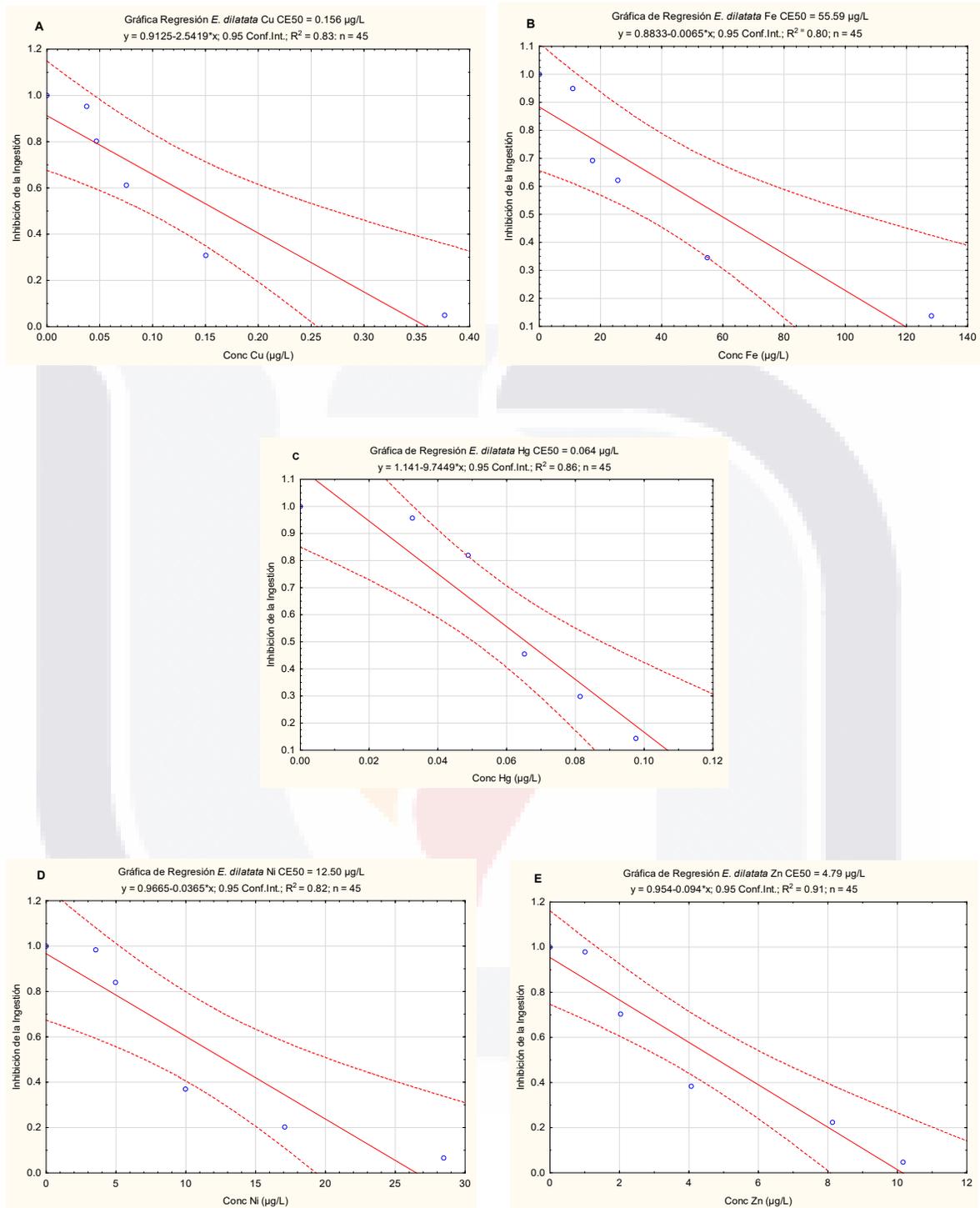
**Cuadro 3.** Resultados para las pruebas aguda y crónicas con *Euchlanis dilatata*.

	Resultados	Cu (µg/L)	Fe (µg/L)	Hg (µg/L)	Ni (µg/L)	Zn (µg/L)
Aguda	CNOE	0.47	91	0.8	7.12	9.24
	CL10	0.75	663	1.7	43	31
	CMOE	0.94	915	2.4	71.2	46
	CL50	3.7	1283	3.7	389	101
	LC 95%	3.2 – 4.4	1170 –	3.2 – 4.3	299 – 506	78 – 131
	R <sup>2</sup>	0.94	1406	0.85	0.91	0.82
	CV%	8.86	0.97	10.37	2.73	16.5
“ <i>r</i> ”	CNOE	2.8	915	0.4	7	46
	CE10	9.3	957	0.5	28	64
	CMOE	3.8	1831	0.8	36	92
	CE50	40.5	2489.4	1.95	129.9	188.3
	LC 95%	7.5 – 73	1970 –	1.7 – 2	120 -140	153 – 224
	R <sup>2</sup>	0.63	3008	0.96	0.99	0.93
	CV%	8.27	0.89	11.35	11.74	6.02
IIng	CNOE	0.037	10.99	0.03	3.56	1.02
	CE10	0.038	11.02	0.028	4.13	1.23
	CMOE	0.047	17	0.049	4.98	2.03
	CE50	0.156	55.59	0.064	12.5	4.79
	LC 95%	0.9 – 2	30 – 81	0.049 –	7.4 – 17.59	3.36 – 6.21
	R <sup>2</sup>	0.83	0.80	0.08	0.82	0.91
	CV%	10.5	3.85	0.86	5.85	2.88
			4.74			

Las gráficas de regresión lineal de las pruebas de “r” y lng de *E. dilatata* se muestran en las Figuras 6 y 7 respectivamente.



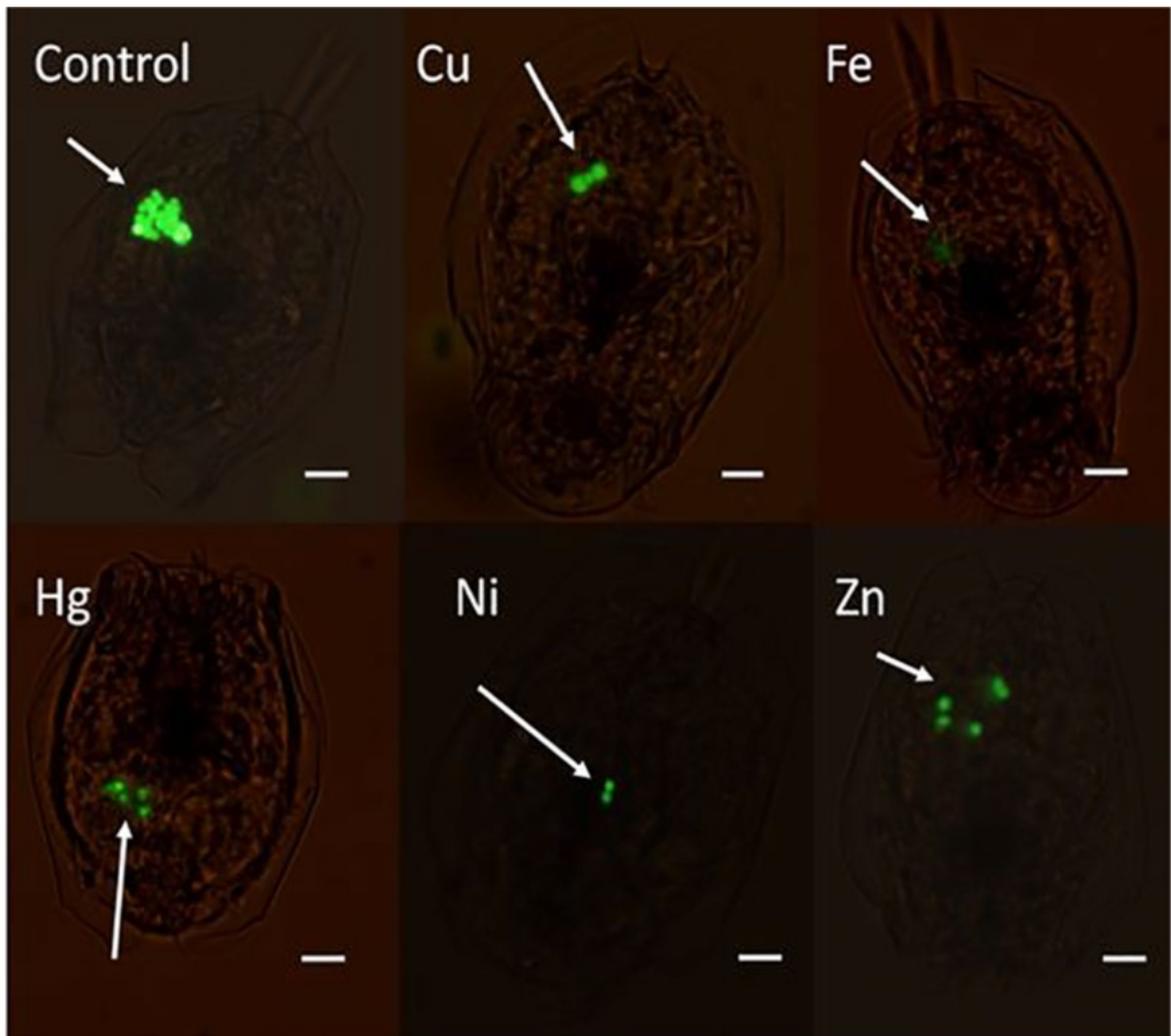
**Figura 6.** Pruebas Crónicas de medición de la tasa Intrínseca de Crecimiento (“r”). Gráficas de regresión lineal entre “r” de *Euchlanis dilatata* y la concentración del metal. A) Cu, B) Fe, C) Hg, D) Ni y E) Zn.



**Figura 7.** Pruebas Crónicas de Inhibición de la Ingestión. Gráficas de regresión lineal entre la Inhibición de la Ingestión de *Euchlanis dilatata* y la concentración del metal. A) Cu, B) Fe, C) Hg, D) Ni y E) Zn.

La Figura 8 muestra la prueba de Inhibición de la Ingestión con *E. dilatata*, se observa mayor cantidad de microesferas en el control negativo al compararlo con la exposición a los metales durante una hora.

**Figura. 8.** Prueba de Inhibición de la Ingestión con *Euchlanis dilatata*. La flecha muestra las microesferas fluorescentes en el intestino del rotífero. Barra = 20  $\mu\text{m}$ , n = 45, magnificación 200x. Las fotografías que se muestran son de la concentración más alta del rango utilizado en la prueba.



### 7.3 Pruebas con *Paramecium caudatum*

#### 7.3.1 Pruebas Agudas *Paramecium caudatum*

Los resultados de las pruebas de toxicidad aguda para los cinco metales se muestran en el Cuadro 4. En todas las pruebas la  $CNOE < CL_{10} < CMOE$ . El  $R^2$  en todas las pruebas fue mayor a 0.76 y el CV% fue menor a 21 %. Los metales con mayor toxicidad fueron: Hg y Cu (Cuadro 4) y el de menor toxicidad fue Fe (Cuadro 4). El orden de toxicidad fue  $Hg > Cu > Ni > Zn > Fe$ . En la Figura 9 se presentan las gráficas de regresión lineal de cada una de las pruebas agudas con *P. caudatum* y los cinco metales.

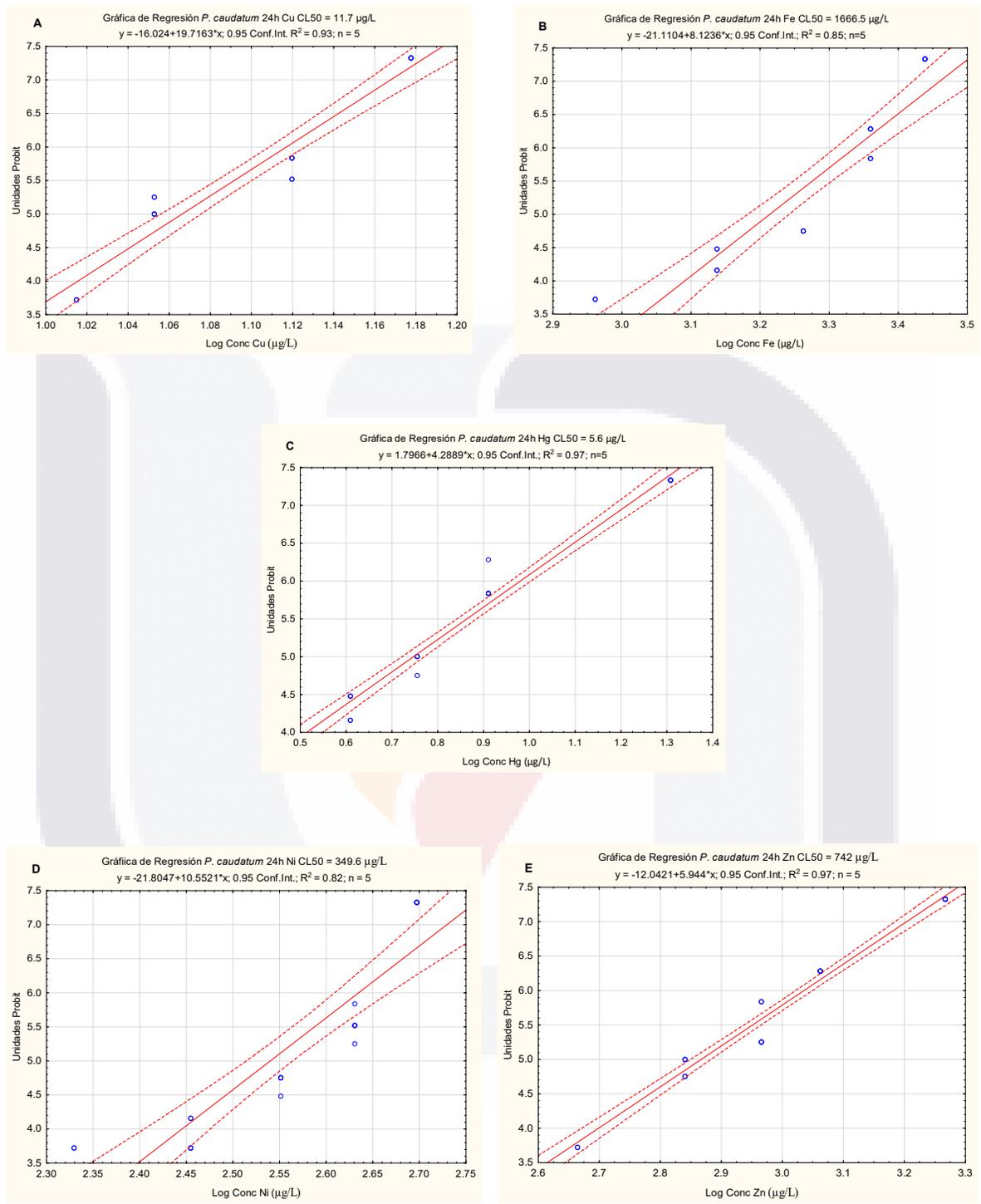
#### 7.3.2 Pruebas Crónicas *Paramecium caudatum*

Los parámetros calculados para las pruebas crónicas de IC e IFV con *P. caudatum*, se muestran en el Cuadro 4. En todas las pruebas la  $CNOE < CL_{10} < CMOE$ . EL  $R^2$  fue mayor a 0.76 y el CV% fue menor a 21 %, el Ni fue el metal que más inhibió el crecimiento de *P. caudatum* con una  $CE_{50} = 66.9 \mu\text{g/L}$ , seguido de Cu con una  $CE_{50} = 72.9$  y el Fe requirió concentraciones muy altas para reducir la inhibición del crecimiento (Cuadro 4). En la prueba de IFV el metal que más afectó la formación de vacuolas fue el Hg, seguido de Cu y se requirieron concentraciones altas de Fe (Cuadro 4) para observar una disminución en la formación vacuolas. Al comparar las  $CE_{50}$  de %IC y las  $CE_{50}$  de IFV, se encontró que las  $CE_{50}$  de IFV fueron más sensibles. Las gráficas de regresión de ambas pruebas crónicas se muestran en las Figuras 10 y 11, respectivamente.

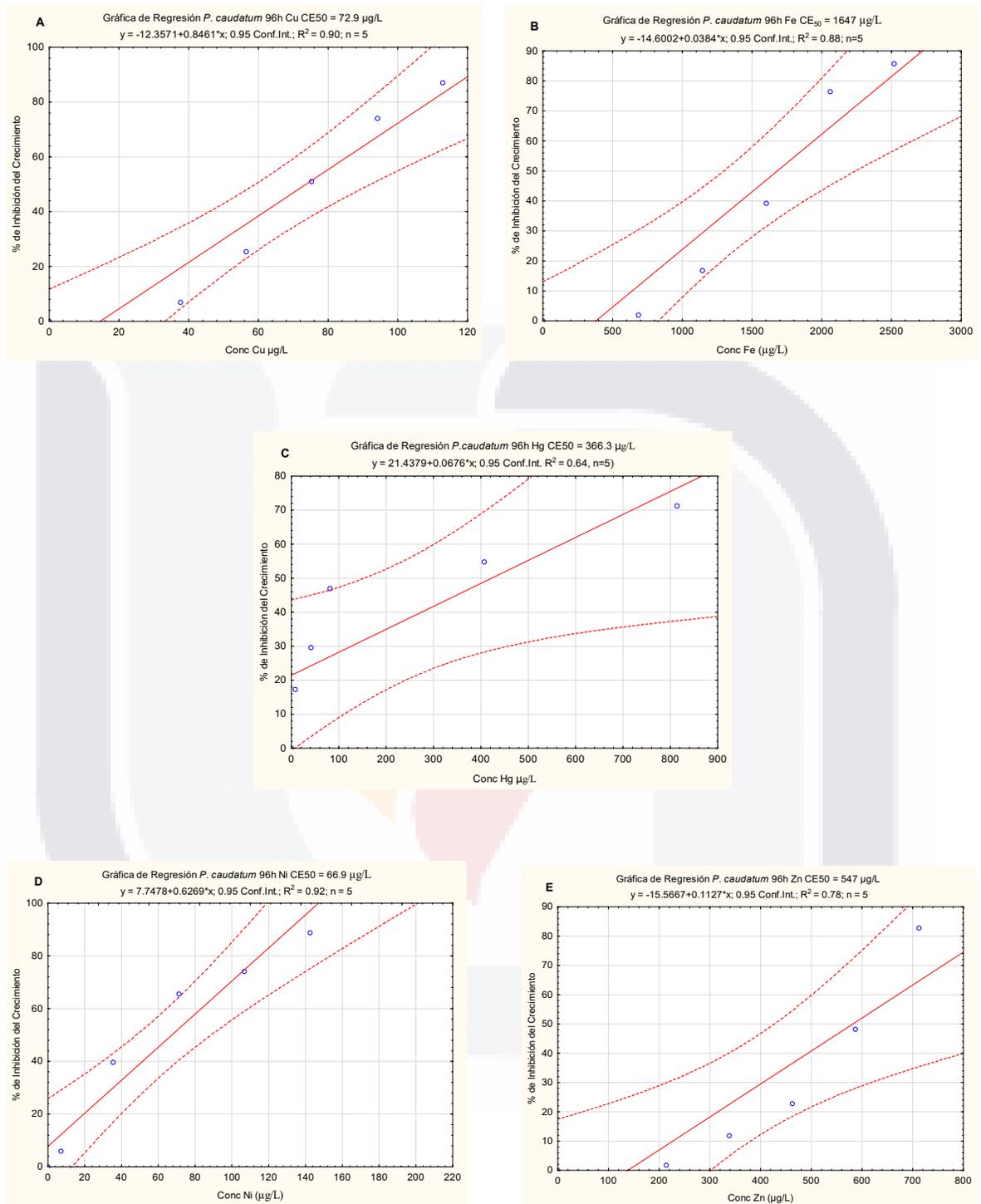
La Figura 12 muestra la prueba de Inhibición de la formación de vacuolas con *P. caudatum*, se observa mayor cantidad de microesferas en el control negativo al compararlo con la explosión a los metales durante una hora.

**Cuadro 4.** Resultados para las pruebas agudas y crónicas con *Paramecium caudatum*.

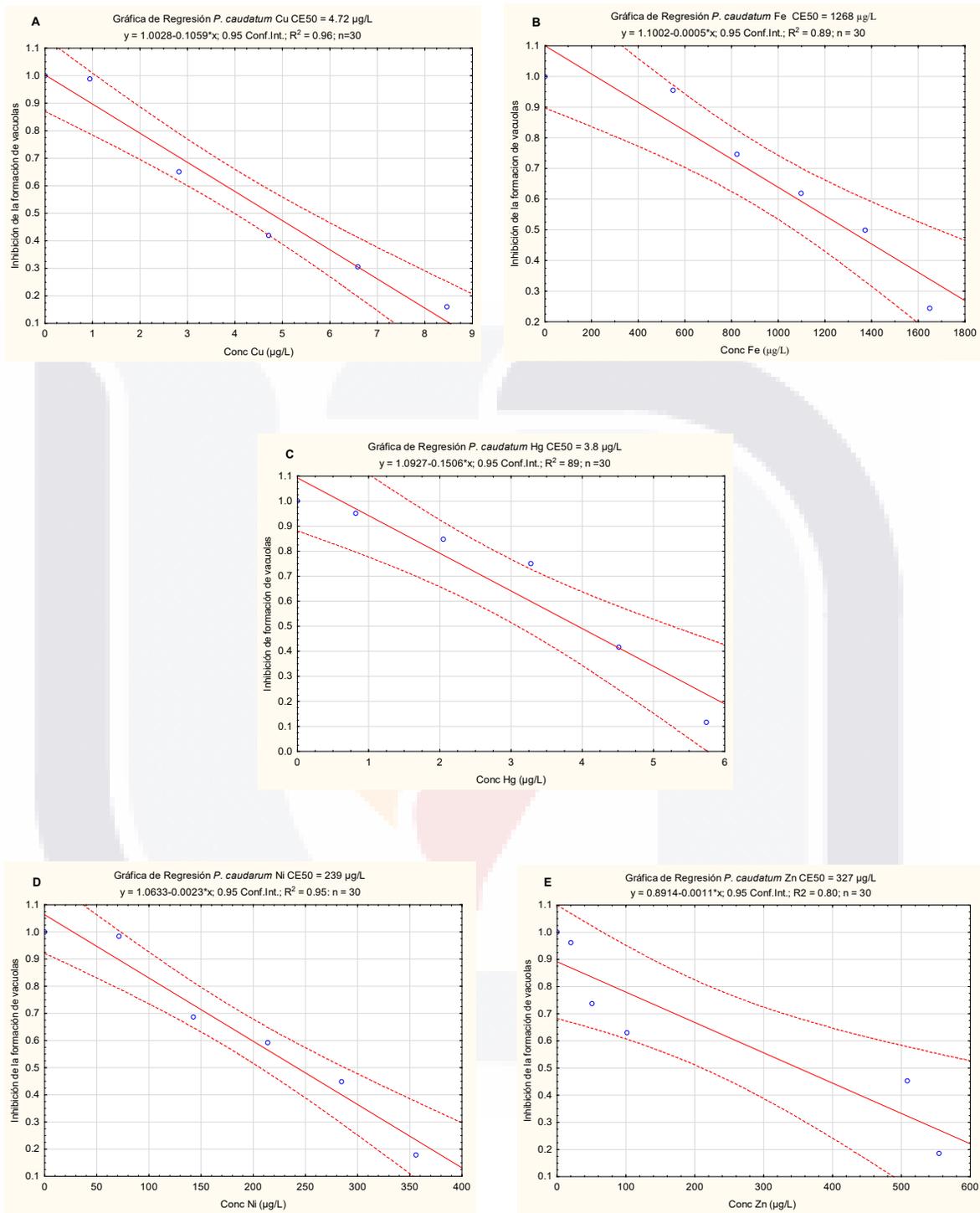
	Parámetros	Cu (µg/L)	Fe (µg/L)	Hg (µg/L)	Ni (µg/L)	Zn (µg/L)
<b>Agudas</b>	<b>CNOE</b>	9.4	915.5	0.81	214	462
	<b>CE10</b>	10.2	1220	2.9	277	480
	<b>CMOE</b>	10.3	1373	4.1	285	693
	<b>CL50</b>	11.7	1666.5	5.6	349.6	742
	<b>LC 95%</b>	11.5 -12	1567- 1773	5.33 – 5.95	332 -368	714-771
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.93	0.85	0.97	0.82	0.97
	<b>CV%</b>	1.83	4.3	4.15	0.49	4.98
<b>Crónica %IC</b>	<b>CNOE</b>	19	687	4.07	7	214
	<b>CE10</b>	29	708	5.48	7.2	255
	<b>CMOE</b>	38	1144	8.14	36	338
	<b>CE50</b>	72.9	1647	366.3	66.9	547
	<b>LC 95%</b>	58 – 87	1256 – 2038	113-620	49 – 85	373 -721
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.90	0.88	0.64	0.92	0.78
	<b>CV%</b>	4.7	1.64	11.98	5.87	4.52
<b>Crónica IFV</b>	<b>CNOE</b>	0.94	549	0.8	71	20
	<b>CE10</b>	1.07	473	1.4	74	26
	<b>CMOE</b>	2.82	824	2	142	51
	<b>CE50</b>	4.72	1268	3.8	239	327
	<b>LC 95%</b>	4 – 5.5	1008 – 1527	3 – 5	201 – 277	180 - 475
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.96	0.89	0.85	0.95	0.80
	<b>CV%</b>	6.79	4.54	4.55	3.72	3.05



**Figura 9.** Pruebas Agudas de *Paramecium caudatum*. Gráficas de regresión lineal entre la mortalidad en Unidades Probit de *Paramecium caudatum* y el Log de la concentración del metal. A) Cu, B) Fe, C) Hg, D) Ni y E) Zn.

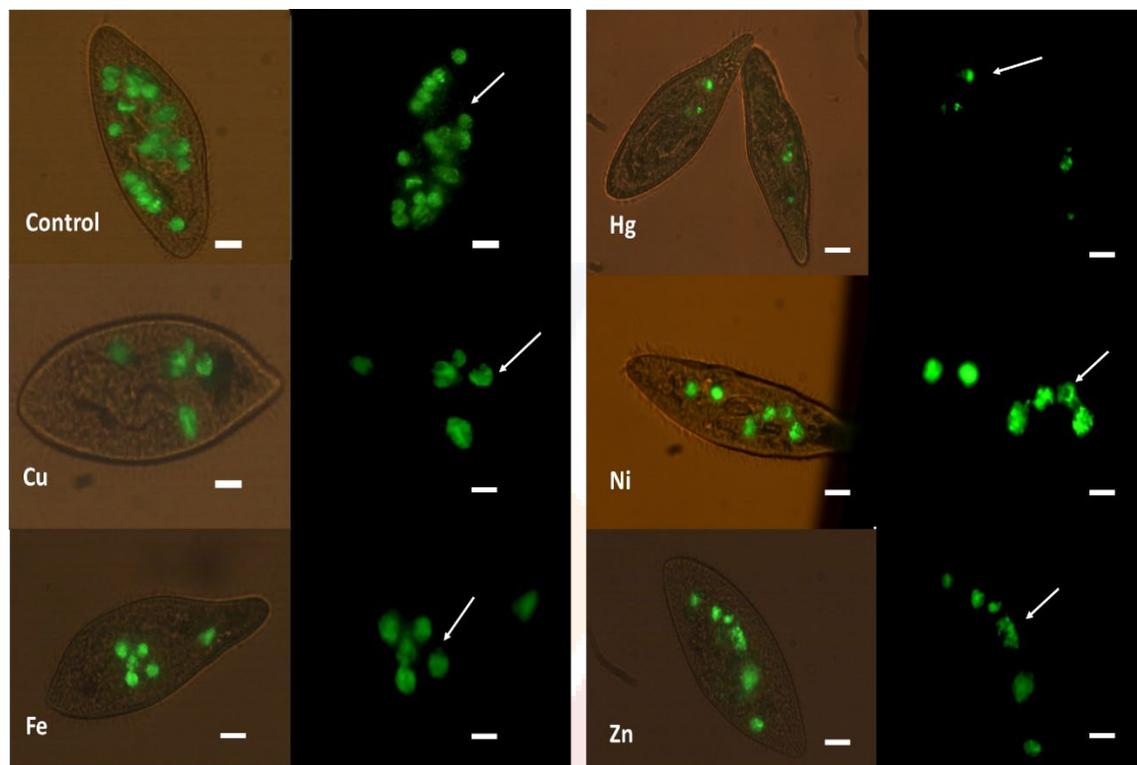


**Figura 10.** Pruebas Crónicas de Inhibición del Crecimiento. Gráficas de regresión lineal entre el % de Inhibición del Crecimiento de *Paramecium caudatum* y la concentración del metal. A) Cu, B) Fe, C) Hg, D) Ni y E) Zn.



**Figura 11.** Pruebas Crónicas de Inhibición de la Formación de Vacuolas. Gráficas de regresión lineal entre la Inhibición de la formación de vacuolas *Paramecium caudatum* y la concentración del metal. A) Cu, B) Fe, C) Hg, D) Ni y E) Zn.

**Figura 12.** Prueba de Inhibición de Vacuolas con *Paramecium caudatum*. La flecha muestra las vacuolas digestivas. Barra = 20 μm, n=30, magnificación 200x. Las fotografías que se muestran son de la concentración más alta del rango utilizado en la prueba.



#### 7.4 Pruebas con *Moina macrocopa*

##### 7.4.1 Pruebas Agudas *Moina macrocopa*

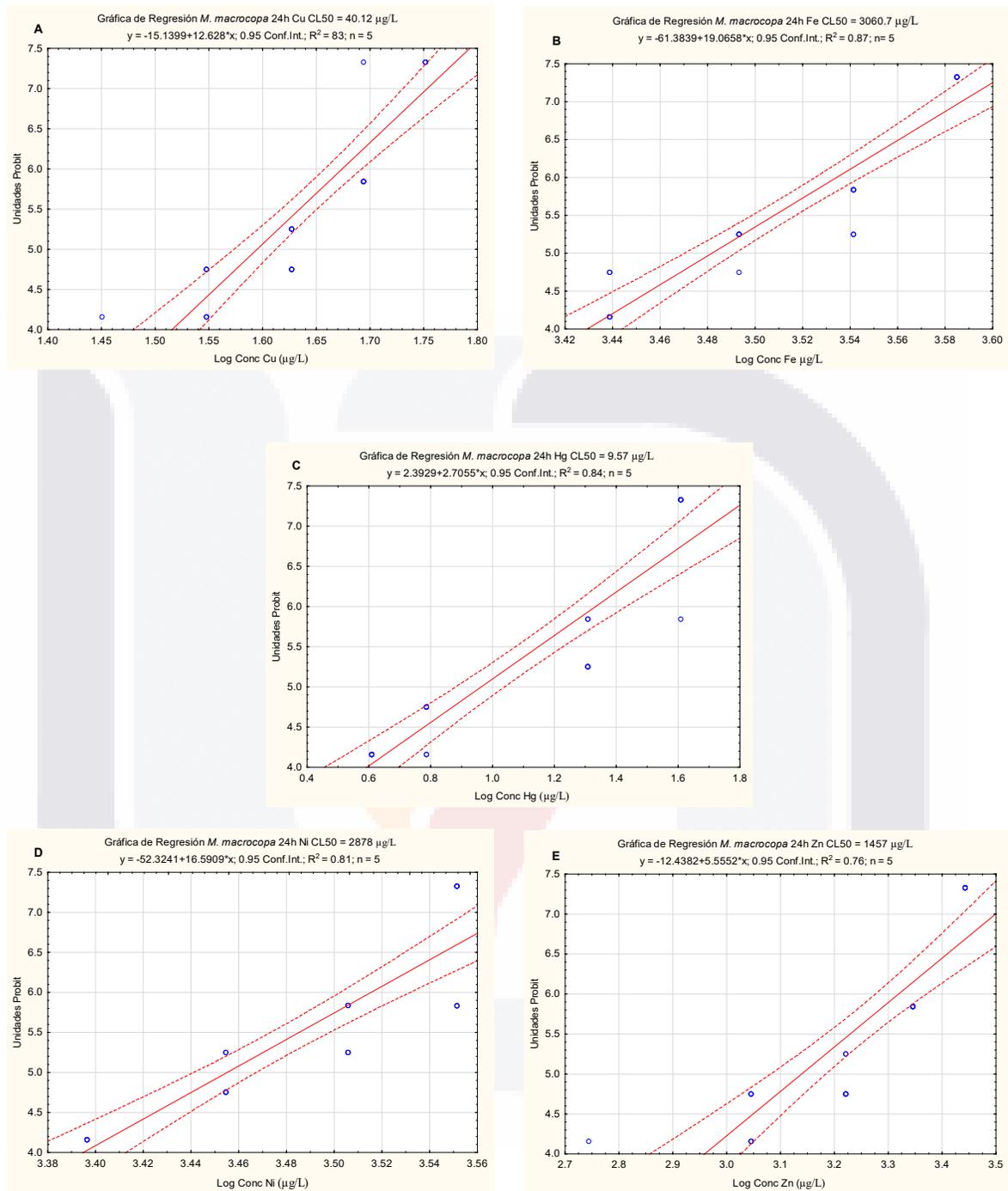
Los resultados de las pruebas de toxicidad aguda para los cinco metales se muestran en el Cuadro 5. En todas las pruebas la  $CNOE < CL10 < CMOE$ . El  $R^2$  en todas las pruebas fue mayor a 0.76 y el CV% fue menor a 21 %. Los metales con mayor toxicidad fueron: Hg y Cu y los de menor toxicidad fueron Fe y Ni (Cuadro 5). El orden de toxicidad fue  $Hg > Cu > Zn > Ni > Fe$ . En la Figura 13 se presentan las gráficas de regresión lineal de cada una de las pruebas agudas con *M. macrocopa* y los cinco metales.

### 7.4.2 Pruebas Crónicas *Moina macrocopa*

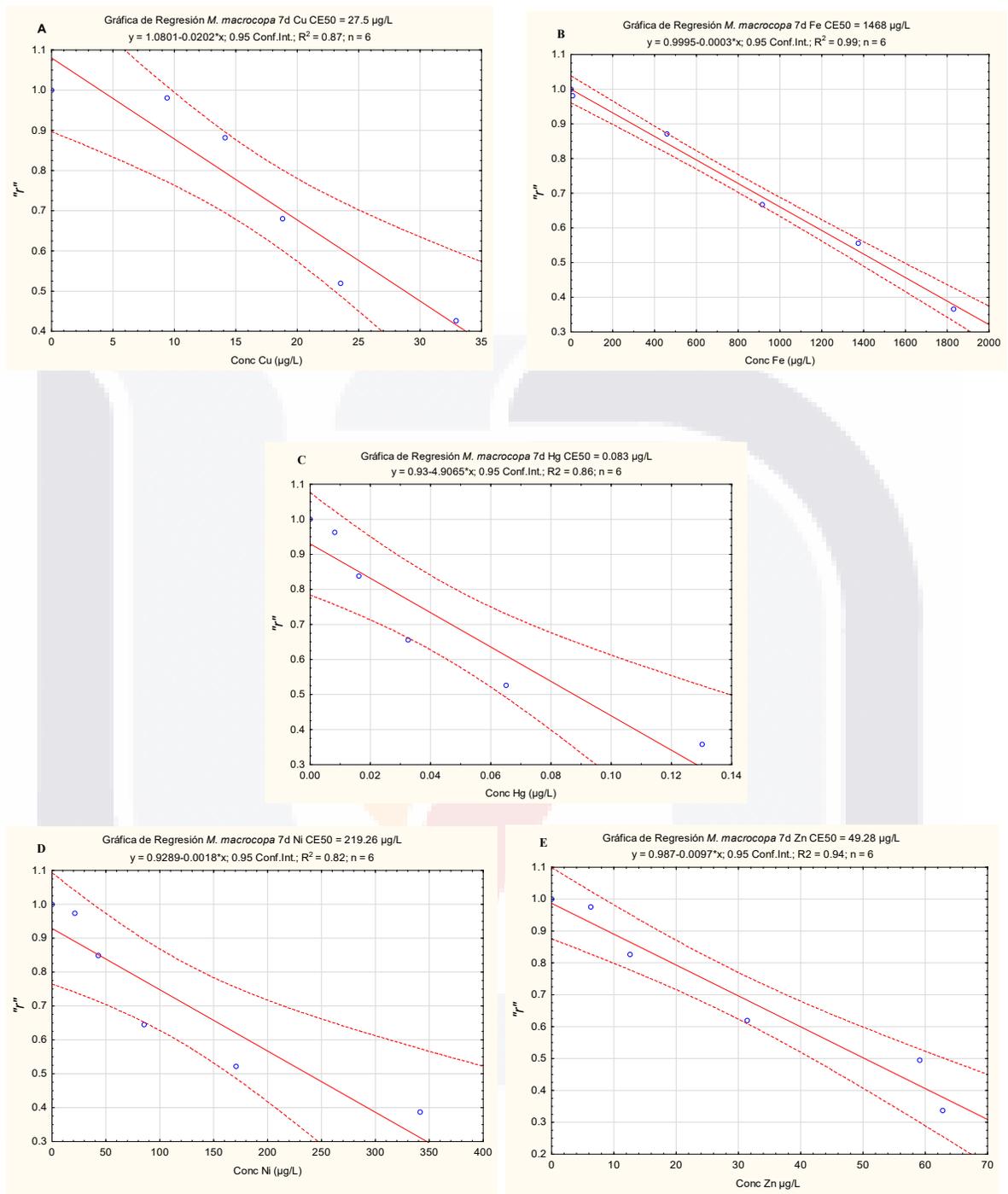
Los resultados para las pruebas crónicas de “r” con *M. macrocopa*, se muestran en el Cuadro 5. En todas las pruebas la CNOE < CL10 < CMOE. EL R<sup>2</sup> fue mayor o igual a 0.76 y el CV% fue menor a 21 %. El Hg fue el metal que más afecto “r”, seguido de Cu y el Fe requirió concentraciones muy altas para afectar a “r” (Cuadro 5). Las gráficas de regresión lineal de la prueba crónicas se muestran en las Figuras 13 y 14.

**Cuadro 5.** Resultados de las pruebas agudas y crónicas con *Moina macrocopa*.

	Parámetros	Cu (µg/L)	Fe (µg/L)	Hg (µg/L)	Ni (µg/L)	Zn (µg/L)
Aguda	CNOE	28	2380	0.81	2136	554
	CL10	33	2672	3.8	2487	971
	CMOE	35.3	2746	4.1	2492	1109
	CL50	40.12	3060.7	9.57	2878	1457
	LC 95%	38.6 - 42	2993 – 3129	8.1 – 11.3	2803 -2954	1323 – 1603
	R <sup>2</sup>	0.83	0.87	0.84	0.81	0.76
	CV%	3.08	2.48	11.56	2.52	9.97
Crónica (“ r” )	CNOE	9	9	0.008	21	7
	CE10	11.3	296	0.01	29	10
	CMOE	14	458	0.016	43	13
	CE50	27.5	1468	0.083	219.26	49.28
	LC 95%	21- 34	1358 -1578	0.05 – 0.11	133 – 306	40 -59
	R <sup>2</sup>	0.87	0.99	0.86	0.82	0.94
	CV%	4.6	7.96	7.07	5.54	4.81



**Figura 13.** Pruebas Agudas de *Moina macrocopa*. Gráficas de regresión lineal entre la mortalidad en Unidades Probit de *Moina Macrocopa* y el Log de la concentración del metal. A) Cu, B) Fe, C) Hg, D) Ni y E) Zn.



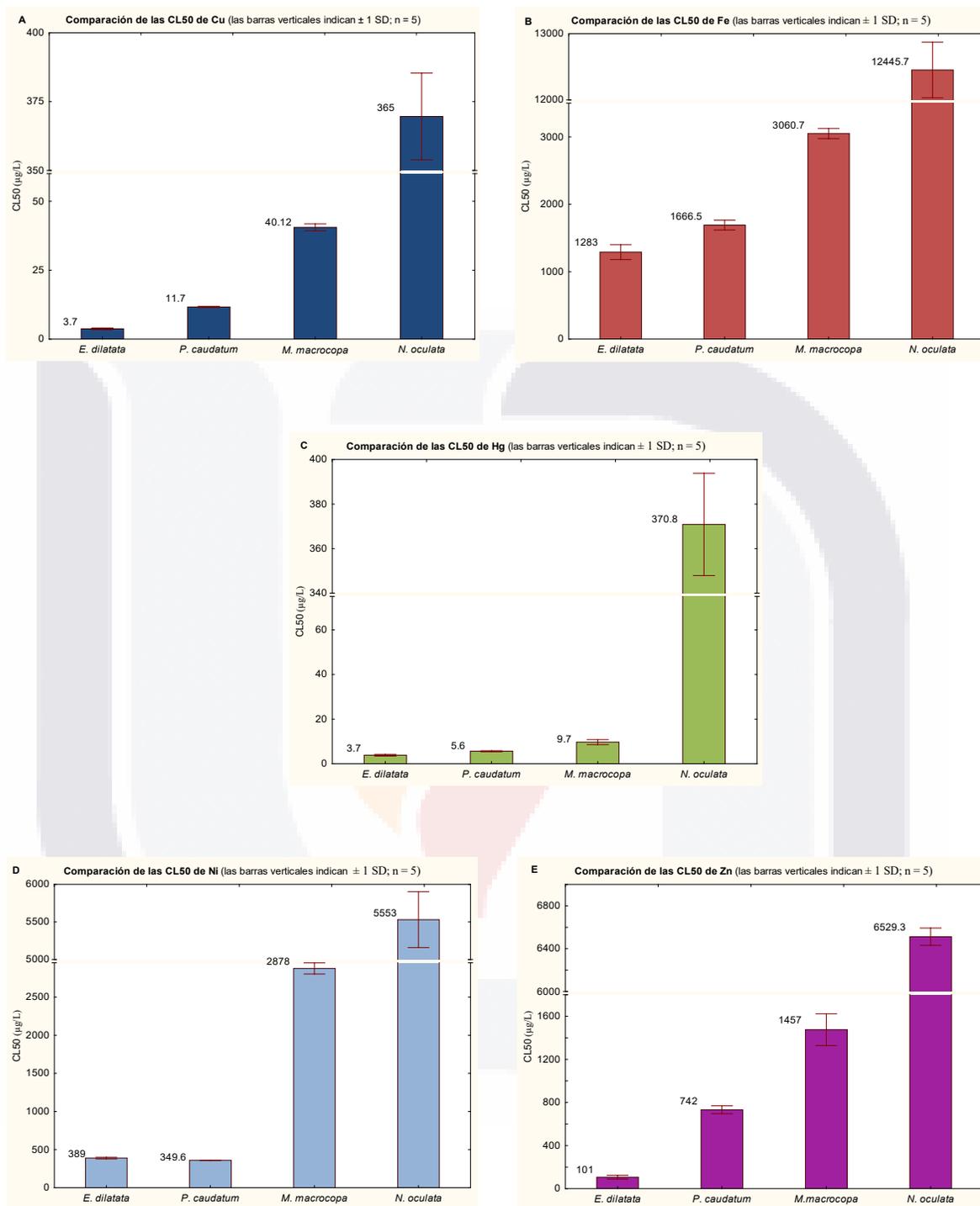
**Figura 14.** Pruebas Crónicas de medición de la tasa Intrínseca de Crecimiento (“r”). Gráficas de regresión lineal entre “r” de *Moina macrocopa* y la concentración del metal. A) Cu, B) Fe, C) Hg, D) Ni y E) Zn.

### 7.5 Comparación de valores CL50

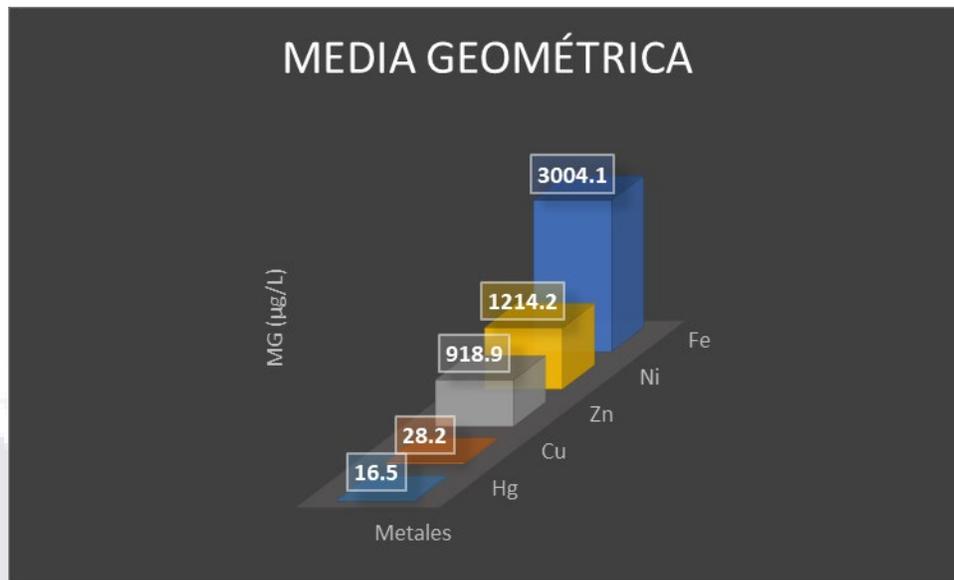
La Figura 15 muestra la comparación de las CL50 de cada metal con cada uno de organismos prueba. La gráfica A muestra la comparación de las CL50 para Cu, *E. dilatata* fue el organismo más sensible, presentó una CL50 de 3.7  $\mu\text{g/L}$ , la CL50 para *N. oculata* fue de 365  $\mu\text{g/L}$ , siendo este el organismo más resistente. En la gráfica B se muestra la comparación de las CL50 para Fe; la CL50 para *E. dilata* fue de 1283  $\mu\text{g/L}$ , y para *N. oculata* fue de 12445.7  $\mu\text{g/L}$  por lo que estos organismos fueron el más sensible y el más resistente respectivamente. La gráfica C muestra la comparación de las CL50 para Hg, *E. dilatata* tuvo una CL50 3.7  $\mu\text{g/L}$  siendo el organismo más sensible, *N. oculata* presentó una CL50 de 370.8  $\mu\text{g/L}$  siendo este el organismo más resistente. La gráfica D muestra la comparación de las CL50 de Ni, la especie más sensible fue *P. caudatum*, presentó una CL50 de 349.6  $\mu\text{g/L}$  y *N. oculata* fue la más resistente con una CL50 de 5553  $\mu\text{g/L}$ . La gráfica E muestra la comparación entre las CL50 de Zn: la CL50 para *E. dilatata* fue de 101  $\mu\text{g/L}$  y para *N. oculata* fue de 6529.3  $\mu\text{g/L}$ , siendo el organismo más sensible y más resistente respetivamente. Hg fue el metal más tóxico para los cuatro organismos.

### 7.6 Media Geométrica

Se calculó la Media Geométrica con los valores de CL50 para obtener el metal que fue más tóxico para el grupo. Como grupo el metal más tóxico fue Hg seguido de Cu, Zn, Ni y Fe (Figura 16).



**Figura 15.** Gráficas con la comparación de las CL50 de cada metal con los cuatro organismos prueba. A) Comparación de las CL50 de Cu, B) Comparación de las CL50 de Fe, C) Comparación de la CL50 de Hg, D) Comparación de la CL50 de Ni, E) Comparación de la CL50 de Zn.



**Figura 16.** Gráfica de comparación de valores obtenidos de la media geométrica de los metales Cu, Hg, Fe, Ni y Zn para las cuatro especies de organismos planctónicos.

## 7.7 Bioconcentración

### 7.7.1 *Euchlanis dilatata*

El peso seco de *E. dilatata* fue de  $1.31 \pm 0.088 \mu\text{g}/\text{individuo}$  (media  $\pm 1$  DE,  $n = 5$ ). Los Factores de Bioconcentración (FBC) de Cu, Fe, Hg, Ni y Zn se muestran en el Cuadro 6. El Zn tiene el valor más alto de FBC, y Ni el valor más bajo de FBC, Cu, también tuvo un valor alto, aunque el Hg no es un microelemento, su FBC fue más grande que el de Fe y Ni estos valores se obtuvieron después de 24 h de exposición al CMOE de cada metal (Cuadro 6). La concentración acumulada de cada metal en *E. dilatata* se determinó después de una exposición de 24 h con los valores correspondientes a la CMOE de cada metal. Zn fue el metal más acumulado en *E. dilatata* ( $\mu\text{g}/\text{individual}$ ) seguido de Fe, Ni, Cu y Hg, la concentración acumulada de cada metal tuvo el siguiente orden decreciente:  $\text{Zn} > \text{Fe} > \text{Ni} > \text{Cu} > \text{Hg}$  (Cuadro 6). Los valores de Carga Corporal Letal (CCL) mostraron que Hg, con una concentración interna de  $3.75 \mu\text{g}/\text{g}$  tiene un efecto letal en el 50 % de la población, mientras que Zn requiere una concentración de  $321.79 \mu\text{g}/\text{g}$  para alcanzar el mismo efecto (Cuadro 6). Cuando se compararon los valores de Carga Corporal Crónica para Inhibición de la Ingestión

( $CCC_{Ing}$ ) y reproducción ( $CCC_{r,r}$ ) se encontró que el metal aumenta con el tiempo. En ambas pruebas, Hg fue el más tóxico y Zn el menos tóxico (Cuadro 6). Se calculó la Proporción Aguda Crónica ( $ACR = CL50 / MATC_{crónico}$  (Concentración Máxima Aceptable de Tóxico)). Los valores de ACR de las pruebas crónicas se presentan en el Cuadro 6, los resultados muestran que los cinco metales la prueba de Ingestión fue más sensible para *E. dilatata* y solo el Ni tiene toxicidad crónica en las pruebas de “r”.

#### 7.7.2 *Paramecium caudatum*

El peso seco de *P. caudatum* fue de  $0.166 \pm 0.026$   $\mu\text{g}/\text{individuo}$  (media  $\pm$  DE,  $n=5$ ). Los Factores de Bioconcentración (FBC) de Cu, Fe, Hg, Ni, Zn se muestran en el Cuadro 7. EL Hg tuvo el valor más alto, seguido de Fe, Zn, Cu y Ni, estos valores se obtuvieron después de 24 de exposición al CMOE de cada metal. La concentración acumulada de cada metal en *P. caudatum* se determinó después de una exposición de 24 h con los valores correspondientes a la CMOE de cada metal. Fe fue el metal que más acumuló *P. caudatum* ( $\mu\text{g}/\text{individual}$ ), seguido de Zn, Ni, Cu y Hg (Cuadro 7). La concentración acumulada de cada metal tuvo el siguiente orden:  $\text{Fe} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Cu} > \text{Hg}$  (Cuadro 7). Los valores de Carga Corporal Letal (CCL) mostraron a Cu y Hg, con una concentración interna muy baja de menos de 200  $\mu\text{g}/\text{g}$  para tener un efecto letal en el 50 % de la población (Cuadro 7), mientras que Fe requiere una concentración 30 veces más alta para alcanzar el mismo efecto (Cuadro 7). Cuando se compararon los valores de Carga Corporal Crónica para la Inhibición de la Formación de Vacuolas ( $CCC_{IFV}$ ) y de la Inhibición de Crecimiento ( $CCC_{\%IC}$ ) se observó que el Cu, Fe y Zn aumentan con el tiempo, no sucede así con Ni. En la prueba de IFV Cu fue el más tóxico y en la prueba de %IC fue Ni (Cuadro 7). Se calculó la Proporción Aguda Crónica ( $ACR = CL50 / MATC_{crónico}$  (Concentración Máxima Aceptable de Tóxico)). Los valores de ACR se presentan en el Cuadro 7, los resultados muestran que Zn presenta toxicidad crónica en la prueba de Inhibición de Vacuolas y Ni presenta toxicidad crónica en la prueba de Inhibición de crecimiento, Cu, Fe y Hg tienen baja toxicidad crónica asociada con ellos en ambas pruebas.

**Cuadro 6.** Factor de Bioconcentración (FBC), Carga Corporal Letal (CCL), Carga Corporal Crónica (CCC<sub>IIng</sub> = Inhibición de la ingestión, CCC<sub>r,r</sub> = Tasa Intrínseca de Crecimiento, y Concentración de metal acumulado en *Euchlanis dilatata* correspondiente a la CMOE aguda de cada metal después de 24 h de exposición. ACR<sub>IIng</sub> = Inhibición de la Ingestión, ACR<sub>r,r</sub> = Tasa Intrínseca de Crecimiento. PS = Peso Seco (media ± 1 DE, n= 5). Para todos los valores (media ± 1 DE, n= 3).

	Concentración de metal acumulada calculada µg/g	Concentración inicial de metal en solución (µg/mL)	Concentración final de metal en solución (µg/mL)	Carga corporal de metal (µg metal por individuo)	FBC	CCL (µg/g PS)	CCC <sub>IIng</sub> (µg/g PS)	CCC <sub>r,r</sub> (µg/g PS)	ACR <sub>IIng</sub>	ACR <sub>r,r</sub>
Cu	4.79 ± 0.03	2.41 x 10 <sup>-3</sup> ± 3 x 10 <sup>-5</sup>	1.23 x 10 <sup>-3</sup> ± 1.1 x 10 <sup>-4</sup>	6.3 x 10 <sup>-9</sup> ± 4 x 10 <sup>-10</sup>	1987.5	7.35	0.31	80.42	88.73	1.14
Fe	144.3 ± 10.3	8.67 x 10 <sup>-3</sup> ± 1.8 x 10 <sup>-2</sup>	8.29 x 10 <sup>-1</sup> ± 1.53 x 10 <sup>-2</sup>	1.9 x 10 <sup>-7</sup> ± 1 x 10 <sup>-8</sup>	166.40	213.49	9.25	414.23	92.84	0.99
Hg	1.02 ± 0.22	1 x 10 <sup>-3</sup> ± 1 x 10 <sup>-5</sup>	7.3 x 10 <sup>-4</sup> ± 5.7 x 10 <sup>-5</sup>	1.3 x 10 <sup>-9</sup> ± 3 x 10 <sup>-10</sup>	1018	3.76	0.065	1.98	91.77	6.41
Ni	13.36 ± 1.01	2.4 x 10 <sup>-2</sup> ± 1.15 x 10 <sup>-2</sup> *	2.39 x 10 <sup>-2</sup> ± 1.12 x 10 <sup>-2</sup>	1.75 x 10 <sup>-8</sup> ± 1 x 10 <sup>-9</sup>	54.98	21.39	0.687	7.14	92.40	44.76
Zn	372.8 ± 32.46	1.17 x 10 <sup>-2</sup> ± 2.88 x 10 <sup>-3</sup>	1.96 x 10 <sup>-2</sup> ± 0.01106	4.9 x 10 <sup>-7</sup> ± 4 x 10 <sup>-8</sup>	3186	321.79	15.26	599.86	70.20	1.86

\*Este valor se calculó de un experimento donde no hubo diferencia significativa entre la concentración de metal inicial y final (Prueba Tukey, p = 0.726).

**Cuadro 7.** Factor de Bioconcentración (FBC), Carga Corporal Letal (CCL), Carga Corporal Crónica (CCC<sub>IFV</sub> = Inhibición de la formación de vacuolas, CCC<sub>%IC</sub> = Tasa Inhibición del crecimiento, y Concentración de metal acumulado en *Paramecium caudatum* correspondiente a la CMOE aguda de cada metal después de 24 h de exposición. ACR<sub>IFV</sub> = Inhibición de la formación de vacuolas, ACR<sub>%IC</sub> = Inhibición del crecimiento. PS = Peso Seco (media ± 1 DE, n= 5). Para todos los valores (media ± 1 DE, n= 3).

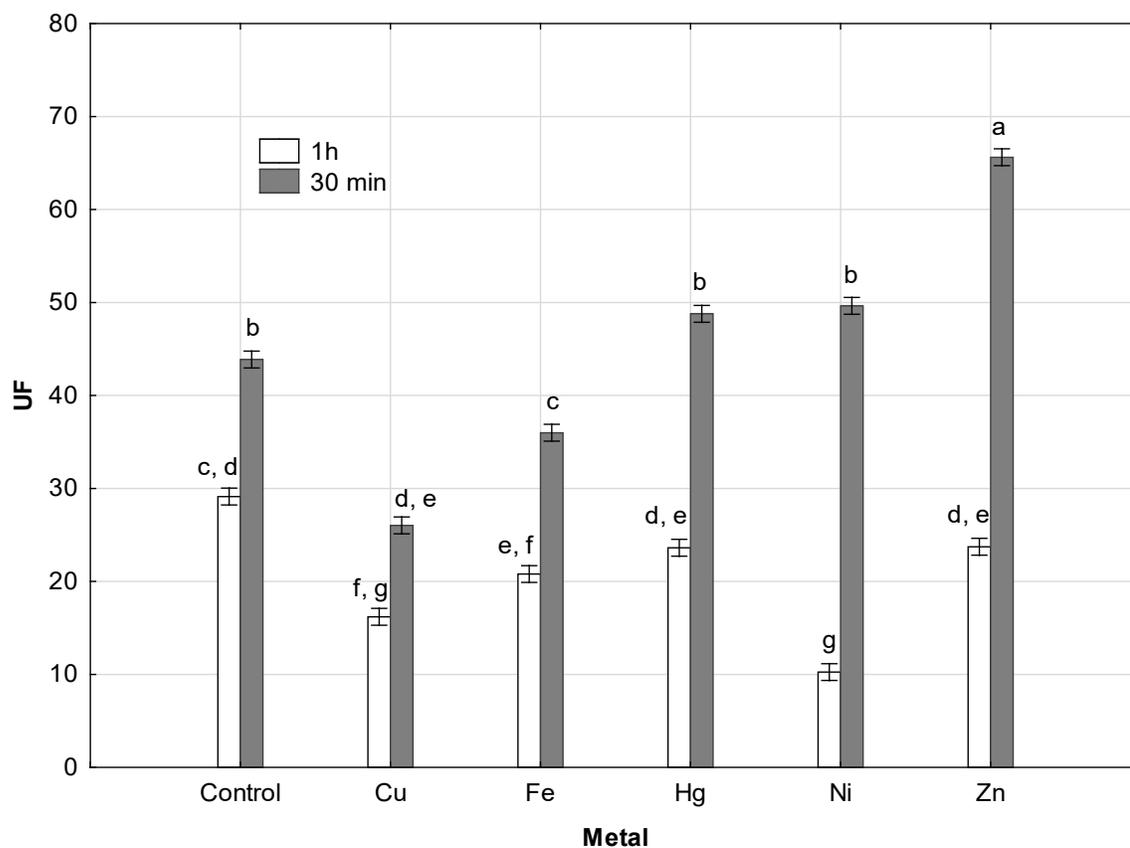
	Concentración de metal acumulada calculada µg/g	Concentración inicial de metal en solución (µg/mL)	Concentración final de metal en solución (µg/mL)	Carga corporal de metal (µg metal por individuo)	FBC	CCL (µg/g PS)	CCC <sub>IFV</sub> (µg/g PS)	CCC <sub>%IC</sub> (µg/g PS)	ACR <sub>IFV</sub>	ACR <sub>%IC</sub>
Cu	234.3 ± 0.92	15.04 x 10 <sup>-3</sup> ± 9 x 10 <sup>-5</sup>	8.55 x 10 <sup>-3</sup> ± 6 x 10 <sup>-5</sup>	3.9 x 10 <sup>-8</sup> ± 1.5 x 10 <sup>-10</sup>	15581	182.3	73.5	1135.9	7.20	0.44
Fe	44721 ± 77	2 ± 7.5 x 10 <sup>-3</sup>	0.76 ± 6.4 x 10 <sup>-3</sup>	7.4 x 10 <sup>-6</sup> ± 1.3 x 10 <sup>-8</sup>	22361	37264	28353	36828	2.48	1.87
Hg	7.45 ± 0.68	2.33 x 10 <sup>-4</sup> ± 2 x 10 <sup>-5</sup>	2.7 x 10 <sup>-5</sup> ± 7 x 10 <sup>-7</sup>	1.2 x 10 <sup>-9</sup> ± 1.1 x 10 <sup>-10</sup>	31900	178.6	121.2	11685	4.43	0.91
Ni	1479.7 ± 11.2	182.9 x 10 <sup>-3</sup> ± 2 x 10 <sup>-3</sup>	0.142 ± 1.7 x 10 <sup>-3</sup>	2.5 x 10 <sup>-7</sup> ± 1.9 x 10 <sup>-9</sup>	8088.8	2827.8	1933.2	541.1	3.48	22.03
Zn	16337.3 ± 289	990.3 x 10 <sup>-3</sup> ± 8 x 10 <sup>-3</sup>	538 x 10 <sup>-3</sup> ± 1.5 x 10 <sup>-3</sup>	2.7 x 10 <sup>-6</sup> ± 4.8 x 10 <sup>-8</sup>	16546	12240	5394.2	9023.3	23.2	2.76

\*Este valor se calculó de un experimento donde no hubo diferencia significativa entre la concentración de metal inicial y final (Prueba Tukey, p = 0.726).

## 7.8 Phen Green

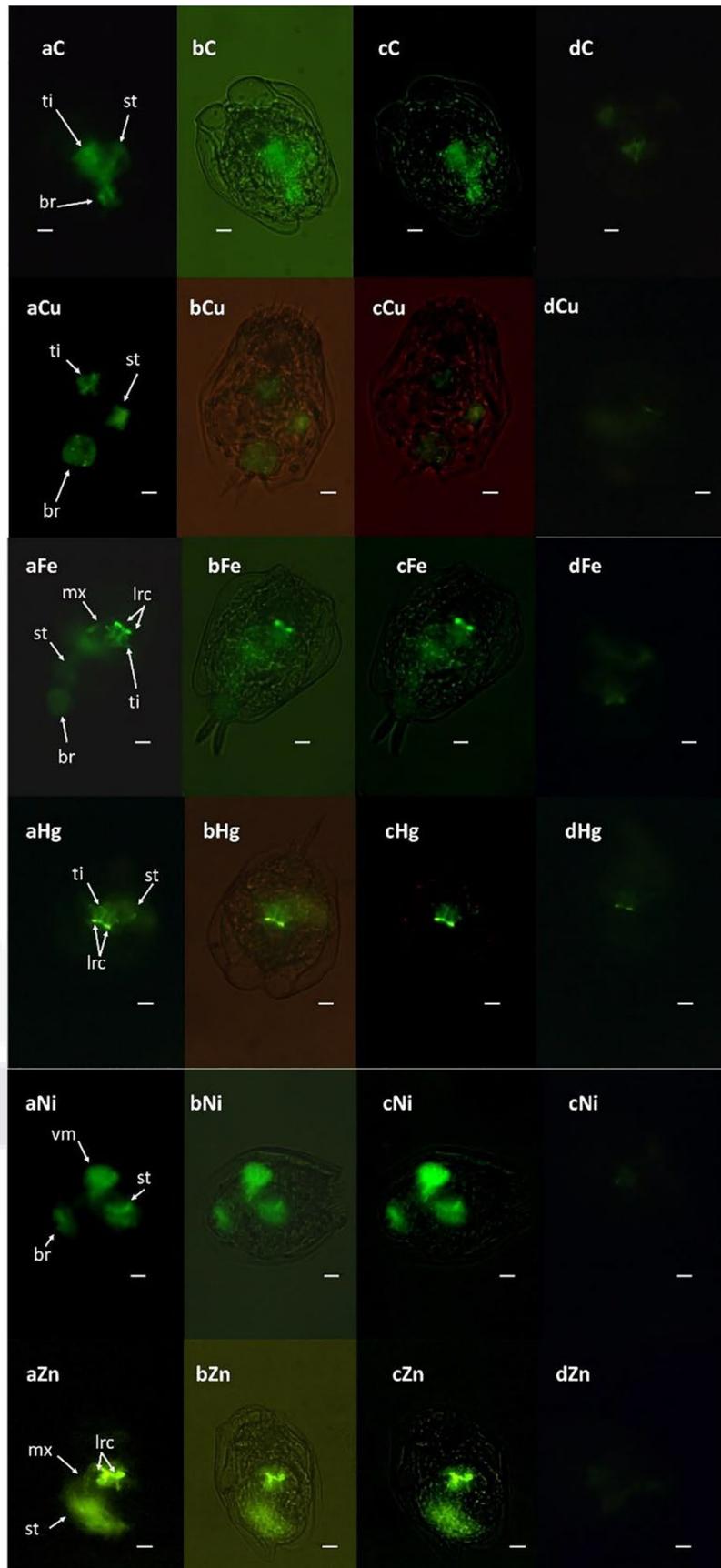
### 7.8.1 *Euchlanis dilatata*

Se realizaron los experimentos con el colorante Phen Green (PG) a dos tiempos de exposición a los 30 min y 1h, la concentración a la cual se expusieron los organismos fue la CL50 de cada metal, se observó disminución de fluorescencia después de 1h en todos los tratamientos, esto significa un aumento en la acumulación de metal en *E. dilatata* (Figura 17). De acuerdo a los resultados, el Zn fue el metal más lento para acumularse después de 30 min de exposición, Hg y Ni tuvieron una acumulación similar después de 30 min, y el metal que se acumuló más rápido fue Cu (Figura 17). Después de 1 h el Ni fue el metal más acumulado en el rotífero (Figura 17). A través del colorante PG, se determinó la acumulación de los metales en los diferentes órganos del rotífero. Debido a que el rotífero es un organismo de alimentación por filtro, en todos los tratamientos, el estómago fue el órgano principal donde se acumularon los metales (Figura 18). El control negativo y Cu (Figura 18aCu) mostraron la fluorescencia más alta en el trophi y la vejiga. El Fe presenta más órganos de acumulación: mastax, retractores laterales de la corona, trophi y vejiga (Figura 18aFe). El Hg afecto principalmente los retractores laterales de la corona y el trophi. (Figura 18aHg). El Ni se acumuló en el vitelario y la vejiga (Figura 18aHg). Zn se encontró en mastax y los retractores laterales de la corona (Figura 18aZn). En la Figura 18 en la columna 3 (d) muestra la disminución en la fluorescencia en todos los tratamientos después de 1 h de exposición con los metales probados.



**Figura 17.** Comparación entre las medias de las unidades de fluorescencia obtenidas en los dos tratamientos con el colorante Phén Green en *Euchlanis dilatata*. (30 min y 1 h de exposición a los metales). N = 30, Media ± Error Estándar, letras iguales no hay diferencias significativas,  $p < 0.05$ .

**Figura 18.** Control negativo de *Euchlanis dilatata* expuesto 15 min a PG, el color verde indica acumulación de metal. Barra blanca = 20  $\mu\text{m}$ , a = luz ultravioleta, b = luz blanca, c = brillo y contraste modificados, d = exposición 1 h. Trofos = ti, estómago = st, vejiga = br, mastax = mt, vitelario = vm, retractores laterales de la corona = lrc. n = 20. Las figuras a, b y c, corresponden a 30 min de exposición. Magnificación = 200x.

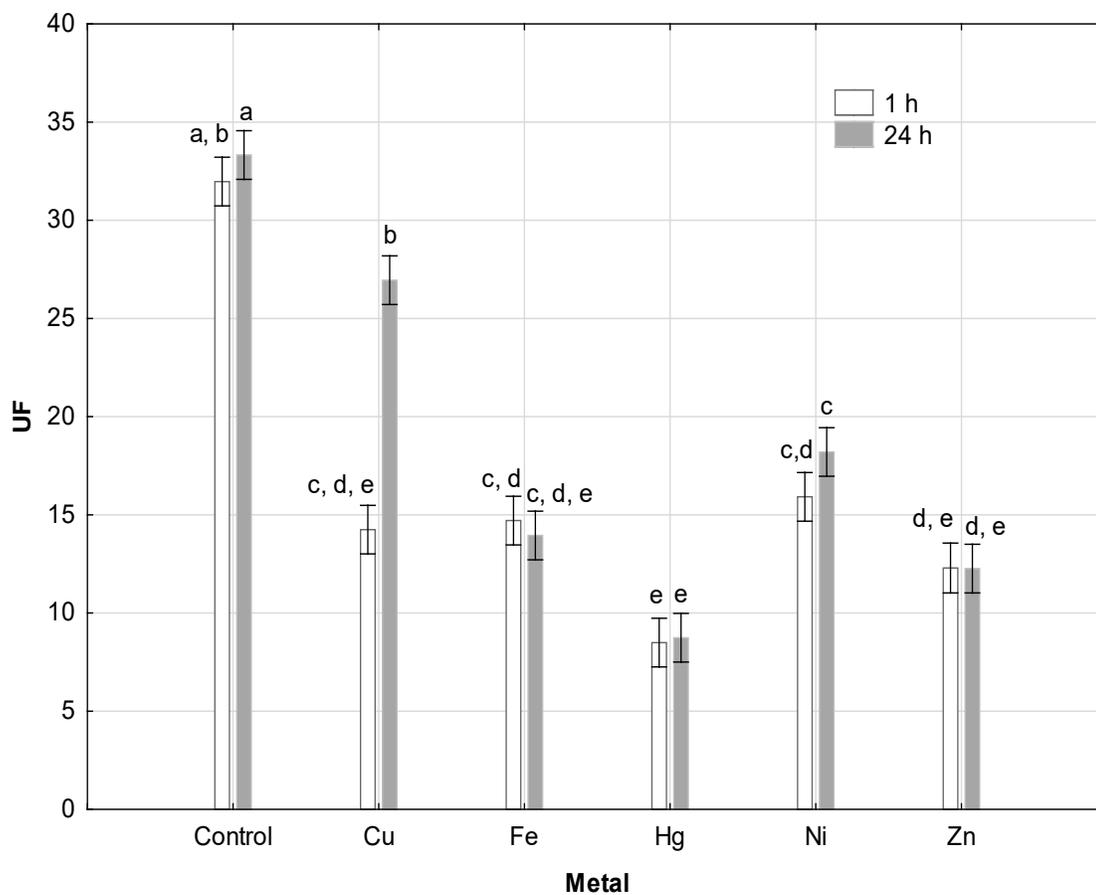


### 7.8.2 *Paramecium caudatum*

Se realizaron los experimentos con el colorante Phen Green (PG) a dos tiempos de exposición a 1 h y 24 h, la concentración a la cual se expusieron los organismos fue la CL50 de cada metal en el tiempo de exposición de 1 h y CMOE en el tiempo de exposición de 24h, no se observó diferencias en la fluorescencia entre ambos tratamientos para Fe, Hg, Ni, Zn, en el caso de Cu se observa mayor fluorescencia a las 24 h (Figura 19). De acuerdo a los resultados, Cu fue el metal más lento para acumularse después de 24h de exposición, Fe, Ni y Zn tuvieron una acumulación similar después de 1 h y 24 h, y el metal que se acumuló más rápido fue Hg en ambos tratamientos (Figura 19).

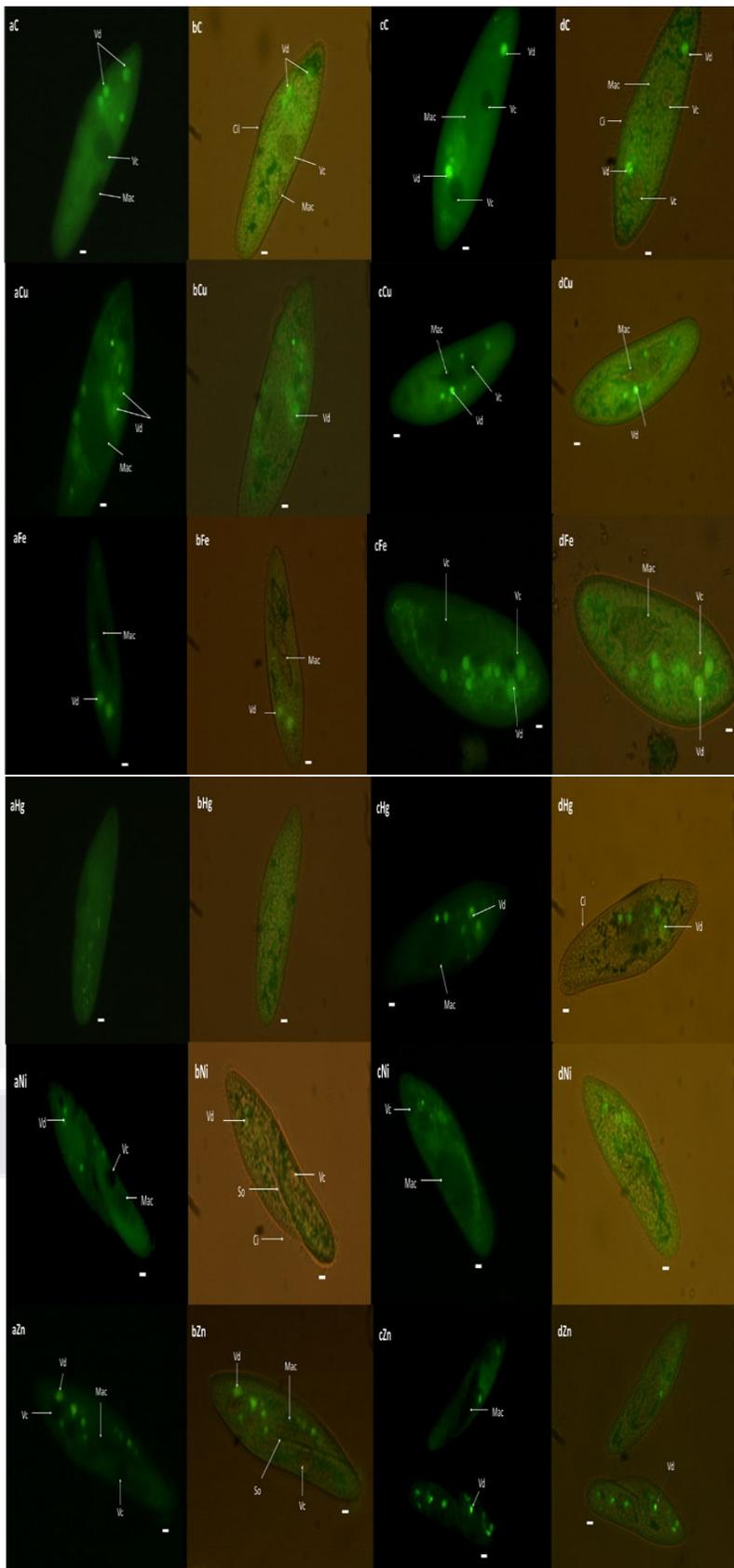
A través del colorante PG, se determinó la acumulación de los metales en *P. caudatum*. Los controles a 1 h y 24 h mostraron una morfología normal, podemos observar el macronúcleo, las vacuolas digestivas y las vacuolas contráctiles (Figuras 20 aC y cC), en la Figuras 20 bC y dC se pueden observar los cilios. En el tiempo de exposición a 1 h de Cu se observa vacuolización del citoplasma, aunque la forma de las vacuolas no se observa bien definida y el macronúcleo se observa de un tamaño mucho mayor (Figuras 20 aCu y bCu), al tiempo de exposición de 24 h se observa el macronúcleo y pequeñas vacuolas (Figura 20 cCu) y en la Figura 20 dCu se observan gránulos oscuros sin fluorescencia. Al exponer a *P. caudatum* a Fe durante 1h se observan vacuolas bien definidas y el macronúcleo mantiene su forma (Figura 20 aFe). En la Figura 20 bFe se pueden ver estructuras oscuras. Al exponer *P. caudatum* a Fe 24 h se observan mayor número de vacuolas y gránulos fluorescentes (Figuras 20 cFe y dFe). En la exposición de Hg durante 1h se observa que la forma de *P. caudatum* se mantiene, pero no se distingue los organelos, se observan gránulos fluorescentes (Figura 20 aHg), en la Figura 20 bHg se observan gránulos fluorescentes y oscuros. En el tiempo de exposición a 24 h se observa el macronúcleo y pequeñas vacuolas con un punto más brillante dentro de ellas (Figura 20 cHg) y en la Figura 20 dHg se pueden observar gránulos oscuros. *P. caudatum* al exponerlo 1h a Ni conserva su forma y podemos observar el macronúcleo, vacuolas contráctiles, vacuolas digestivas pequeñas y el surco oral (Figuras 20 aNi y bNi), al exponerlo 24 h solo se observa un macronúcleo grande y gránulos fluorescentes (Figuras cNi y dNi). A 1 h de exposición a Zn, *P. caudatum* conservó su forma y se pueden observar

organelos como vacuolas contráctiles, digestivas y el macronúcleo (Figuras 20 aZn y bZn), al exponerlo por 24 h se observan pequeñas vacuolas digestivas (Figuras cZn y dZn).



**Figura 19.** Comparación entre las medias de las unidades de fluorescencia obtenidas en los dos tratamientos con el colorante Phén Green en *Paramecium caudatum* (30 min y 1 h de exposición a los metales), N = 30, Media ± Error Estándar, p<0.05.

**Figura 20.** Control negativo de *Paramecium caudatum* expuesto 15 min a PG, el color verde indica acumulación de metal. Barra blanca = 20  $\mu\text{m}$ , a y b = luz ultravioleta, c y d = luz blanca, Cil = Cilios, Mac = Macronúcleo, So = Surco oral, Vc = Vacuola contráctil Vd = Vacuola digestiva. Las figuras a y b corresponden a 1 h de exposición de metal, c y d corresponden a 24 h de exposición de metal. Magnificación = 200x.



## 7.9. Distribución de sensibilidad de especies (DSE)

Las DSE se construyeron utilizando datos agudos y crónicos de los 4 grupos de organismos planctónicos utilizados en este trabajo principalmente (algas verdes, rotíferos, ciliados y cladóceros). Los datos de CL50 utilizados para la construcción de la DSE son a 24h, los datos agudos a 24h para algas verdes son escasos.

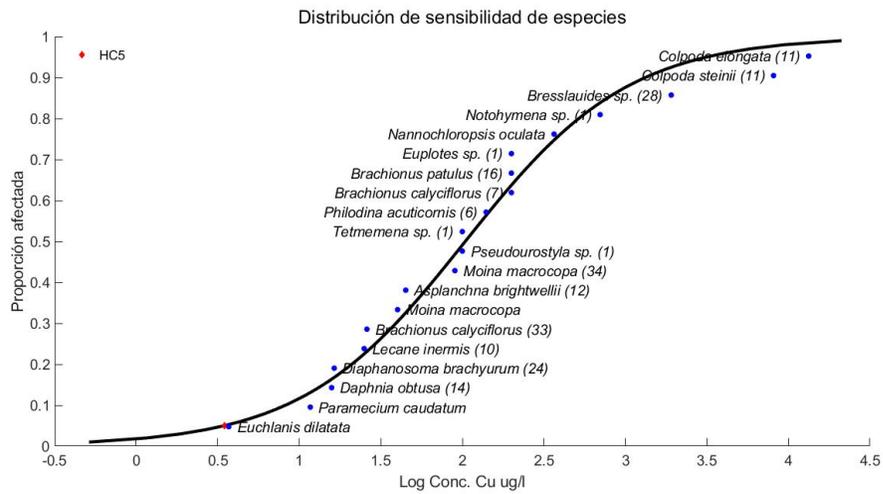
Para la DSE Aguda de Cu se utilizaron 20 especies (Figura 21). El valor HC5 fue de 3.466  $\mu\text{g/L}$  y el valor de HC50 fue de 104.296  $\mu\text{g/L}$  (Cuadro 8). En la DSE Crónica de Cu se utilizaron 14 especies (Figura 22). El valor HC5 fue de 1.252  $\mu\text{g/L}$  y el valor de HC50 fue de 52.619  $\mu\text{g/L}$ .

En la construcción de la DSE Aguda de Fe se utilizaron 9 especies (Figura 23). El valor HC5 fue de 61.431  $\mu\text{g/L}$  y el valor de HC50 fue de 708.426  $\mu\text{g/L}$  (Cuadro 8). En la DSE Crónica de Fe se utilizaron 12 especies (Figura 24). El valor HC5 fue de 5.635  $\mu\text{g/L}$  y el valor de HC50 fue de 475.175  $\mu\text{g/L}$ .

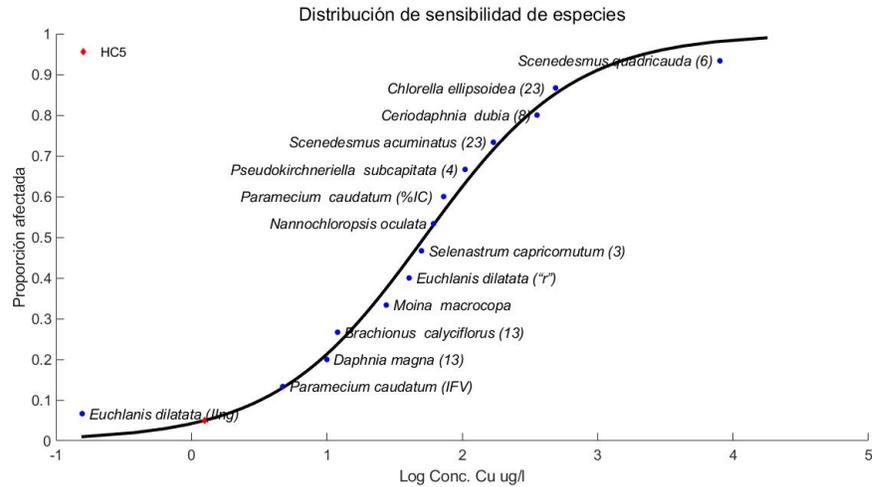
En la construcción de la DSE Aguda de Hg se utilizaron 9 especies (Figura 25). El valor HC5 fue de 0.222  $\mu\text{g/L}$  y el valor de HC50 fue de 60.237  $\mu\text{g/L}$  (Cuadro 8). En la DSE Crónica de Hg se utilizaron 13 especies (Figura 26). El valor HC5 fue de 0.184  $\mu\text{g/L}$  y el valor de HC50 fue de 31.156  $\mu\text{g/L}$ .

Para la construcción de la DSE Aguda para Ni se utilizaron 16 especies (Figura 27). El valor HC5 fue de 150.755  $\mu\text{g/L}$  y el valor de HC50 fue de 2300  $\mu\text{g/L}$  (Cuadro 8). En la DSE Crónica para Ni se utilizaron 13 especies (Figura 28). El valor HC5 fue de 17.910  $\mu\text{g/L}$  y el valor de HC50 fue de 168.992  $\mu\text{g/L}$ .

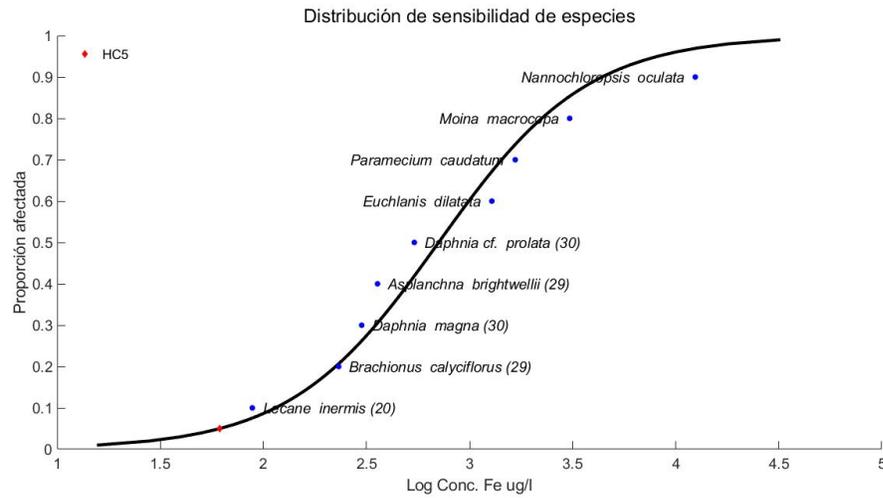
En la construcción de la DSE Aguda para Zn se utilizaron 22 especies (Figura 29). El valor HC5 fue de 26.018  $\mu\text{g/L}$  y el valor de HC50 fue de 1290  $\mu\text{g/L}$  (Cuadro 8). En la DSE Crónica para Zn se utilizaron 17 especies (Figura 30). El valor HC5 fue de 5.064  $\mu\text{g/L}$  y el valor de HC50 fue de 611.146  $\mu\text{g/L}$ .



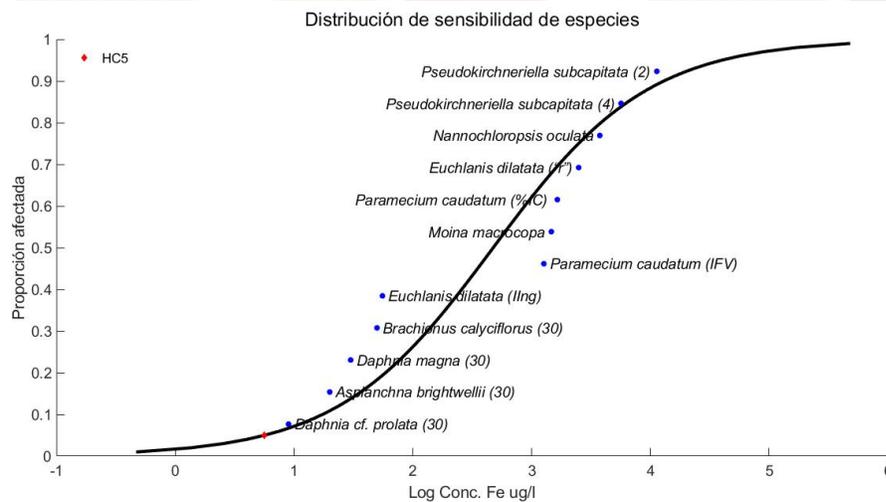
**Figura 21.** Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos agudos (CL50 µg/L) para Cu. El número entre paréntesis indica la referencia. Las especies sin referencia son las estudiadas en este trabajo. (1) Abraham *et al.*, 2017; (6) Cairns *et al.*, 1978; (7) Couillard, 1989; (10) Deleebecq *et al.*, 2009; (11) Díaz *et al.*, 2006; (12) Enesco *et al.*, 1989; (14) Gaete y Chávez 2008; (16) Hawryshyn y Mackay, 1979, (24) Mano *et al.*, 2011; (28) Pudpong y Chantangsi, 2015; (33) Snell *et al.*, 1991; (34) Wong 1992.



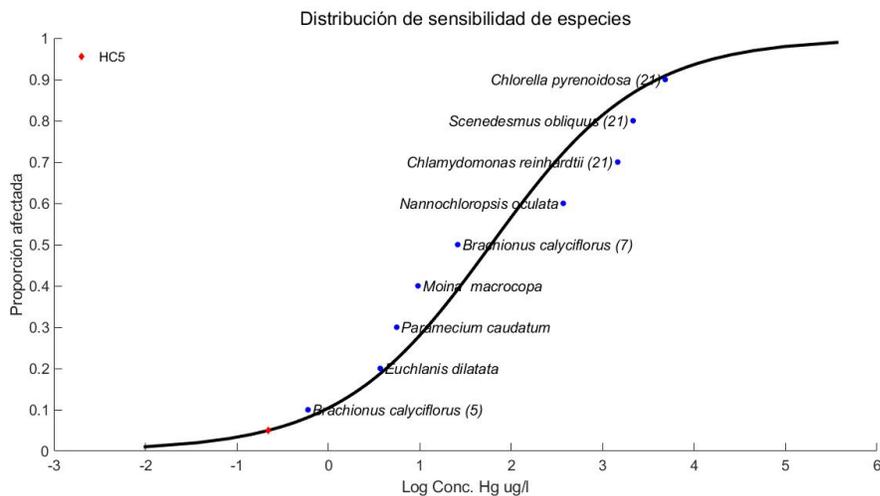
**Figura 22.** Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos crónicos (CE50 µg/L) para Cu. El número entre paréntesis indica la referencia. Las especies sin referencia son las estudiadas en este trabajo. Inng = Inhibición de la Ingestión, "r" = Tasa Intrínseca de crecimiento, %IC = % de Inhibición del crecimiento, IFV = Inhibición de la formación de vacuolas. (3) Bartlett *et al.*, 1974; (4) Berrebaan *et al.*, 2018; (6) Cairns *et al.* 1978; (8) Cowgill y Milazzo, 1991; (13) Ferrando y Andreu, 1993; (23) Magdaleno *et al.* 2013.



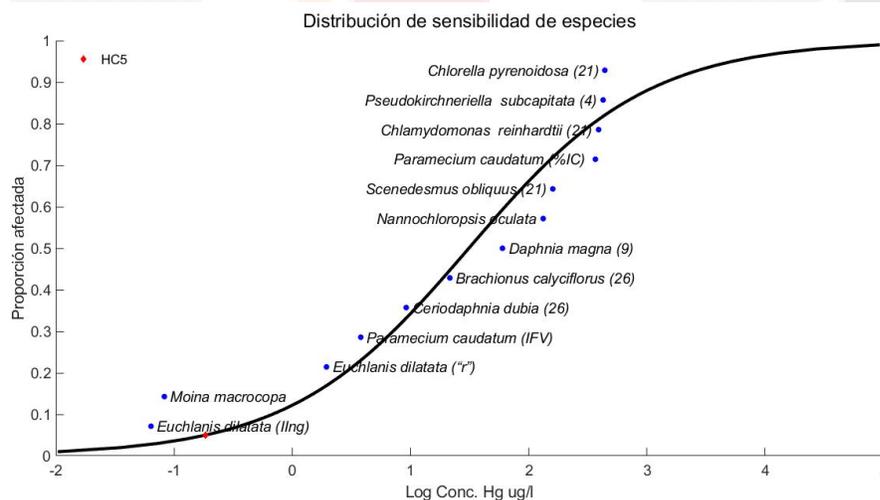
**Figura 23.** Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos agudos (CL50 µg/L) para Fe. El número entre paréntesis indica la referencia. Las especies sin referencia son las estudiadas en este trabajo. (20) Klimek *et al.*, 2013, (29) Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2013; (30) Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2015.



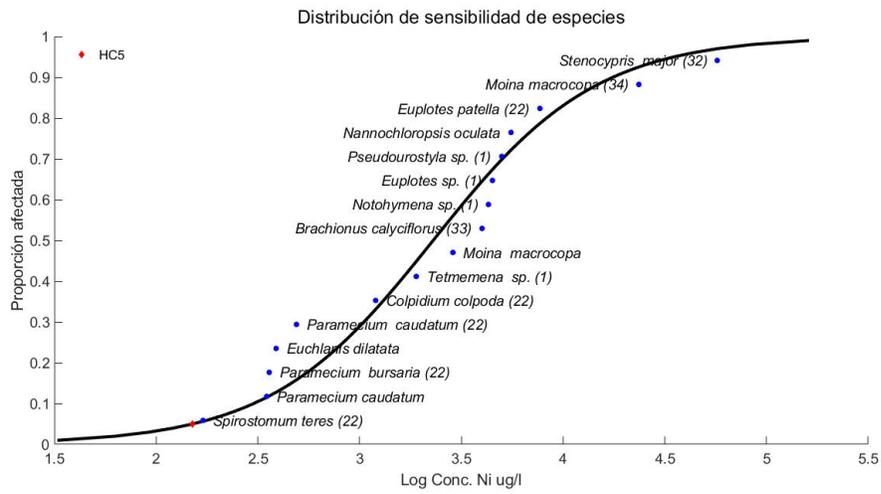
**Figura 24.** Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos crónicos (CE50 µg/L) para Fe. El número entre paréntesis indica la referencia. Las especies sin referencia son las estudiadas en este trabajo. IIng = Inhibición de la Ingestión, "r" = Tasa Intrínseca de crecimiento, %IC = % de Inhibición del crecimiento, IFV = Inhibición de la formación de vacuolas. (2) Arbildua *et al.*, 2016; (4) Berrebaan *et al.*, 2018; (30) Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2015.



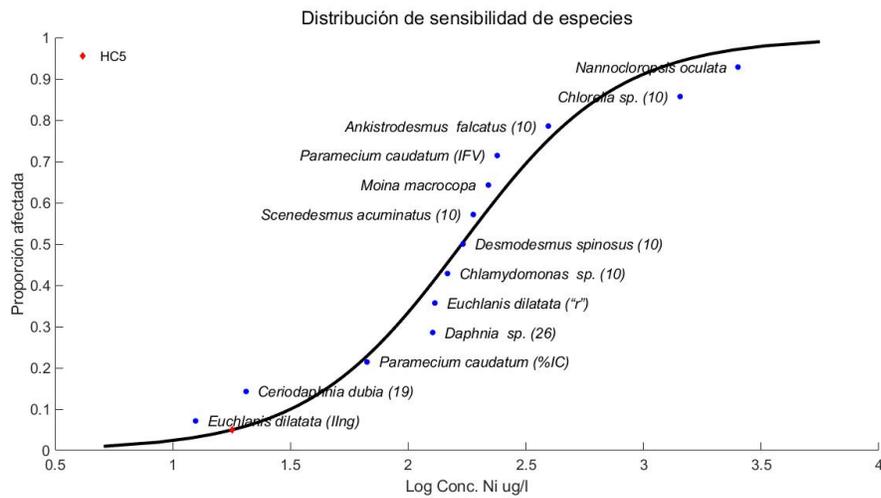
**Figura 25.** Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos agudos (CL50 µg/L) para Hg. El número entre paréntesis indica la referencia. Las especies sin referencia son las estudiadas en este trabajo. (5) Burbank y Snell, 1994; (7) Couillard, 1989; (21) Li *et al.*, 2012.



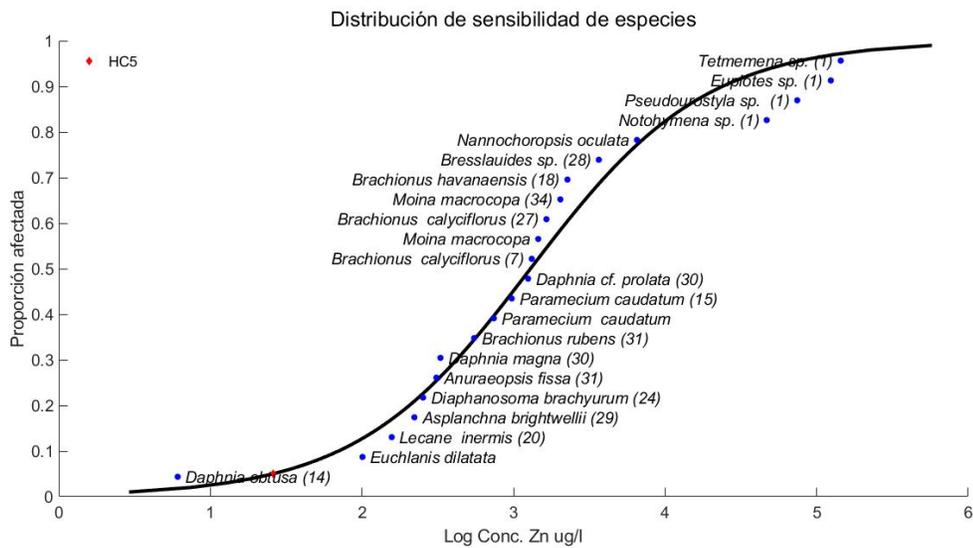
**Figura 26.** Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos crónicos (CE50 µg/L) para Hg. El número entre paréntesis indica la referencia. Las especies sin referencia son las estudiadas en este trabajo. IIng = Inhibición de la Ingestión, "r" = Tasa Intrínseca de crecimiento, %IC = % de Inhibición del crecimiento, IFV = Inhibición de la formación de vacuolas. (4) Berrebaan *et al.*, 2018; (9) De Coen *et al.*, 1998; (21) Li *et al.*, 2012; (26) Mu *et al.*, 2014



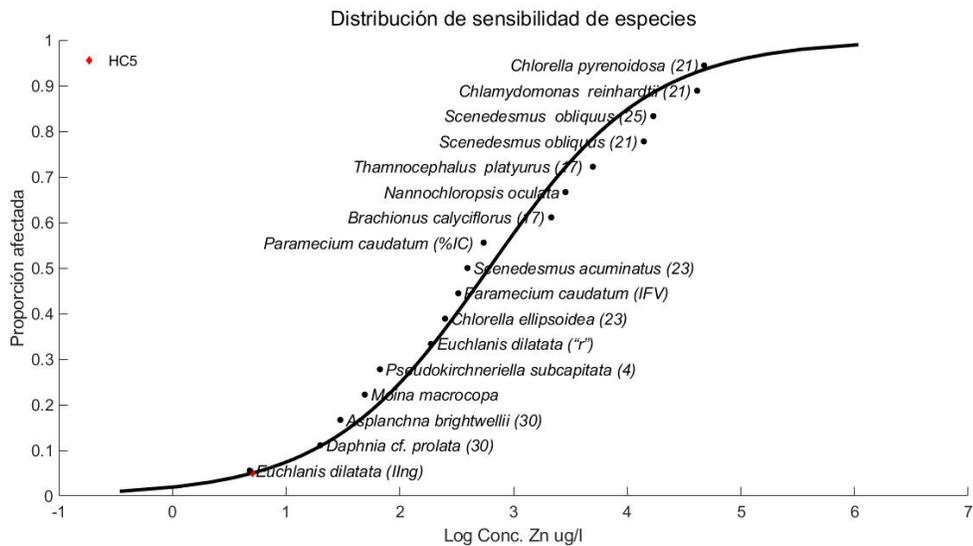
**Figura 27.** Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos agudos (CL50 µg/L) para Ni. El número entre paréntesis indica la referencia. Las especies sin referencia son las estudiadas en este trabajo. (1) Abraham *et al.*, 2017; (22) Madoni, 2000; (32) Shuhaimi-Othman *et al.*, 2014; (33) Snell *et al.*, 1991; (34) Wong, 1992.



**Figura 28.** Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos crónicos (CE50 µg/L) para Ni. El número entre paréntesis indica la referencia. Las especies sin referencia son las estudiadas en este trabajo. IIng = Inhibición de la Ingestión, "r" = Tasa Intrínseca de crecimiento, %IC = % de Inhibición del crecimiento, IFV = Inhibición de la formación de vacuolas. (10) Deleebeek *et al.*, 2009; (19) Keithly *et al.*, 2004; (26) Mu *et al.*, 2014.



**Figura 29.** Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos agudos (CL50 µg/L) para Zn. El número entre paréntesis indica la referencia. Las especies sin referencia son las estudiadas en este trabajo. (1) Abraham *et al.*, 2017; (7) Couillard, 1989; (14) Gaete y Chávez, 2008; (15) Gong *et al.*, 2014; (18) Juárez-Franco *et al.*, 2007; (20) Klimek *et al.*, 2013; (24) Mano *et al.*, 2011; (27) Nelson y Roline, 1998; (28) Pudpong y Chantangsi, 2015; (29) Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2013; (30) Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2015; (31) Sarma *et al.*, 2007; (34) Wong, 1992.



**Figura 30.** Gráfica de Distribución de Sensibilidad de Especies basada en datos crónicos (CE50 µg/L) para Zn. El número entre paréntesis indica la referencia. Las especies sin referencia son las estudiadas en este trabajo. 11ng = Inhibición de la Ingestión, "r" = Tasa Intrínseca de crecimiento, %IC = % de Inhibición del crecimiento, IFV = Inhibición de la formación de vacuolas. (4) Berrebaan *et al.*, 2018; (17) Jawecki *et al.*, 2011; (21) Li *et al.*, 2012; (23) Magdaleno *et al.*, 2013; (25) Monteiro *et al.*, 2011; (30) Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2015

**Cuadro 8.** Distribución de Sensibilidad de Especies. Datos Agudos y Crónicos.

	<b>HCp</b>	<b>µg/L</b>	<b>LC</b>
Cu Aguda	5	3.466	0.782-15.358
	50	104.296	43.256-251.469
Cu Crónica	5	1.252	0.163-9.587
	50	52.619	17.058-162.312
Fe Aguda	5	61.431	12.581-299.952
	50	708.426	272.179-1840
Fe Crónica	5	5.635	0.414-76.652
	50	475.175	101.376-2230
Hg Aguda	5	0.222	0.0059-8.343
	50	60.237	6.316-574.453
Hg Crónica	5	0.184	0.0092-3.697
	50	31.156	5.861-165.597
Ni Aguda	5	150.755	38.087-596.701
	50	2300	1030-5120
Ni Crónica	5	17.910	5.033-63.726
	50	168.992	83.233-343.108
Zn Aguda	5	26.018	5.065-133.659
	50	1290	497.949-3370
Zn Crónica	5	5.064	0.514-49.838
	50	611.146	154.010-2430

## 8. Discusión

Este trabajo es el primero en integrar resultados de FBC, sitios de entrada y acumulación y mecanismos de absorción de cinco metales en el rotífero *Euchlanis dilatata* y el ciliado *Paramecium caudatum* correlacionando estos valores con los de pruebas agudas y crónicas (valores reales) y carga corporal aguda y crónica y su relación con la toxicidad. También se realizaron pruebas agudas y crónica con el alga verde *Nannochloropsis oculata* y el cladóceros *Moina macrocopa*. Este análisis integral ayuda a comprender mejor los mecanismos que estos metales ejercen sobre los organismos planctónicos.

### 8.1 *Nannochloropsis oculata*

En relación con la CL50, *N. oculata* es más sensible a Cu y Hg. El orden de toxicidad es  $Cu = Hg > Ni > Zn > Fe$ , se necesitan concentraciones muy altas de Fe, Ni y Zn para que se presenten efectos letales. Al comparar los valores de CL10 Cu es más tóxico. Los datos de CL50 a 24 h con algas verdes son muy escasos. Li *et al.* (2012) reportó CL50 de 1460  $\mu\text{g/L}$ , 2150  $\mu\text{g/L}$ , 4830  $\mu\text{g/L}$  de Hg para *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella pyrenoidosa* respectivamente, *N. Oculata* es 4 veces más sensible a Hg (370.8  $\mu\text{g/L}$ ) que *Chlamydomonas reinhardtii* (Figura 25). *N. oculata* es el organismo menos sensible de los cuatro utilizados en este trabajo a los 5 metales en las pruebas agudas.

Con respecto a la CE50 el metal más tóxico fue Cu, el orden de toxicidad es  $Cu > Hg > Ni > Zn > Fe$ . El valor de CE50 de Cu para *N. oculata* 61.39  $\mu\text{g/L}$ , Bartlett *et al.* (1974) reporta un valor de CE50 de Cu de 50  $\mu\text{g/L}$ , estos valores son muy cercanos, otras algas menos sensibles a Cu reportadas son: *Ceriodaphnia dubia*, *Chlorella ellipsoidea*, *Scenedesmus quadricauda* con CE50 de 357  $\mu\text{g/L}$  (Cowgill y Milazzo, 1991), 489  $\mu\text{g/L}$  (Magdaleno *et al.*, 2013), 8000  $\mu\text{g/L}$  (Cairns *et al.*, 1978) respectivamente (Figura 22). Las algas requieren como Cu como micronutriente para su crecimiento y reproducción, pero el exceso de cobre es altamente tóxico para la mayoría de las algas (Guanzon *et al.*, 1994). *N. oculata* (CE50 = 132.5  $\mu\text{g/L}$ ) es más sensible a Hg comparada con otras especies como: *Scenedesmus obliquus* (160  $\mu\text{g/L}$ , Li *et al.*, 2012), *Chlamydomonas reinhardtii* (390  $\mu\text{g/L}$ , Li *et al.*, 2012), *Pseudokirchneriella subcapitata* (426  $\mu\text{g/L}$ , Barrebaan *et al.*, 2018), *Chlorella pyrenoidosa* (440  $\mu\text{g/L}$ , Li *et al.*, 2012). (Figura 26). El Hg es un metal no esencial y muy tóxico con capacidad redox que puede aumentar el estado oxidante al reducir la reserva

antioxidante (Okamoto *et al.*, 2001). Comparada con *Pseudokirchneriella subcapitata* (CE50 = 11330 µg/L, Arbildua *et al.*, 2016) y *Pseudokirchneriella subcapitata* (CE50 = 5662 µg/L, Barrebaan *et al.*, 2018), *N. oculata* (CE50 = 3755 µg/L) es más sensible a Fe (Figura 24). *N. oculata* (CE50 = 2519 µg/L) es muy tolerante a Ni comparada con otras especies de alga como: *Chlamydomonas sp.* (CE50 = 147 µg/L), *Desmodesmus spinosus* (CE50 = 171 µg/L), *Scenedesmus acuminatus* (CE50 = 189 µg/L) y *Ankistrodesmus falcatus* (CE50 = 394 µg/L), *Chlorella sp.* (CE50 = 1430 µg/L) (Deleebeeck *et al.*, 2009) (Figura 28). De las especies con las que se compara la sensibilidad de *N. oculata* (CE50 = 2867 µg/L) a Zn se observan especies más sensibles como: *Pseudokirchneriella subcapitata* (CE50 = 67 µg/L, Barrebaan *et al.*, 2018), *Chlorella ellipsoidea* (CE50 = 250 µg/L, Magdaleno *et al.*, 2013), y menos sensibles como: *Scenedesmus obliquus* (CE50 = 14020 µg/L, Li *et al.*, 2013), *Scenedesmus obliquus* (CE50 = 16990 µg/L, Monteiro *et al.*, 2013), *Chlamydomonas reinhardtii* (CE50 = 47520 µg/L, Li *et al.*, 2013) y *Chlorella pyrenoidosa* (CE50 = 47520 µg/L, Li *et al.*, 2013) (Figura 30). Zn es un elemento traza esencial, sin embargo, llega a ser tóxico en altas concentraciones, puede disminuir la división celular, movilidad y contenido de clorofila total (Omar, 2002), estos efectos se relacionan a la unión con grupos-SH de proteínas en la membrana plasmática (Nalimova *et al.*, 2005).

En las algas, la toxicidad resulta principalmente de la unión de los metales a los grupos sulfhidrilo de las proteínas o a la alteración de la estructura de la proteína o al desplazamiento de un elemento esencial. Los metales pueden romper el equilibrio oxidativo de las algas, induciendo enzimas antioxidantes como SOD, GPX y APX (Arunakumara and Xuecheng, 2008).

## 8.2 *Euchlanis. dilatata*

En relación con la CL50, el Hg, el único metal no traza utilizado en este trabajo es el más tóxico junto con Cu. El orden de toxicidad de los metales probados es Hg = Cu > Zn > Ni > Fe. Comparando los valores de CL10, Cu es más tóxico que Hg. En términos de Carga Corporal Letal (CCL) y Carga Corporal Crónica de ambas pruebas Inhibición de la Ingestión y Tasa Intrínseca de crecimiento ( $CCC_{Ing}$ ,  $CCC_{r'}$ ), el Hg es más tóxico (Cuadro 6). Este trabajo es uno de los pocos en el cual se ha calculado la carga corporal en rotíferos. La Carga

Corporal es importante porque permiten comprender la concentración de un tóxico que los organismos son capaces de tolerar antes de que ocurran efectos adversos (tanto crónicos como letales). Proporciona información útil, estudios centrados en la bioacumulación podrían utilizar los datos de Carga Corporal para integrar el análisis de toxicidad y decidir si la concentración del tóxico recolectado en el campo podría causar efectos adversos.

El mecanismo de toxicidad del metal observado a través de los valores agudos y crónicos muestra que *E. dilatata* reduce su tasa de ingestión a concentraciones muy bajas ( $EC50_{Ing} = 0.064 \mu\text{g} / \text{L}$  para Hg en el Cuadro 3) para casi todos los metales. Sin embargo, el efecto sobre la reproducción se observa a concentraciones cercanas o superiores a los valores de CL50 (ver Cuadro 3). Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren un mecanismo uniforme en el que la toxicidad del metal inhibe la tasa de ingestión, pero no afecta la reproducción de manera significativa. Gilbert y Starkweather (1977) afirmaron que los rotíferos tienen la capacidad de seleccionar partículas que pueden pasar al mastax y cuáles son desviadas y no conducen al sistema digestivo, esto es posible por la presencia de cirros en el pseudotrochus. Esta capacidad está regulada por el sistema nervioso, por lo tanto, un tóxico puede alterar esta respuesta e inducir una parálisis que podría manifestarse como una reducción de la ingestión (Ferrando y Andreu 1993). Otra posibilidad es que el rotífero pueda seleccionar las células de las algas que no tienen iones metálicos adheridos en su superficie por medio de los cilios adheridos al mastax (Clément *et al.*, 1980). Por lo tanto, *E. dilatata* puede reducir los efectos adversos sobre la reproducción eligiendo las partículas de algas menos intoxicadas durante las pruebas de reproducción crónica de 5 días. El efecto de mortalidad entonces afecta la reproducción como se observa cuando se compara los valores de CL50 y  $CE50_{R}$  (Cuadro 3). La reproducción en *E. dilatata* se afecta ligeramente por los metales. De hecho, los valores de  $CE50_{R}$  para Cu, Fe y Zn son más altos que los valores de CL50. Esta resistencia a los efectos sobre la reproducción de los metales puede deberse también a que Cu, Fe y Zn generan la producción de lípidos en *N. oculata* (Dou *et al.*, 2013). Por tanto, las microalgas pueden absorber una mayor cantidad de iones metálicos contribuyendo al crecimiento de *E. dilatata* por la presencia de una mayor cantidad de contenido lipídico en los alimentos y mejorando la resistencia contra los metales por la ingesta de algas (Jeon *et al.*, 2010).

El uso de Phen Green nos permite determinar la velocidad de concentración de los metales. Después de 30 min de exposición: Cu > Fe > Hg = Ni > Zn. Esta disposición varió después de 1 h de exposición: Ni > Cu > Fe > Hg = Zn. Esto es muy interesante porque el Hg (que es el único metal sin trazas utilizado en este trabajo) está entre los más lentos en concentrarse, pero es el más tóxico. Phen Green se une a cationes divalentes, y nuestros resultados podrían sugerir que el rotífero *E. dilatata* tiene mecanismos para permitir la entrada más rápida de metales traza en oposición a los metales no traza como el Hg. Además, con el Phen Green se determina que el órgano principal para la acumulación de los cinco metales es el estómago y que cada metal individual tiene diferentes sitios de acumulación: Cu se encontró en los trofos y la vejiga, Fe en el mastax y los retractores laterales de la corona y el trofos, Ni en el vitelario. y vejiga, Zn en mastax y retractores laterales de corona y Hg en retractores laterales de corona y el trofos. Varios autores han usado diferentes técnicas para determinar la acumulación de metales dentro de los rotíferos. Alvarado-Flores *et al.* (2012), determinó plomo en *B. calyciflorus* (mastax, estómago, y vitelario) mediante colorante Leadmium Green AM. Woelfl *et al.* (2016) utilizaron espectrometría de fluorescencia de rayos X de reflexión total para determinar elementos traza en todo el cuerpo en diferentes especies de rotíferos. Alvarado-Flores y Rico-Martínez (2017) determinaron la distribución de plomo en *L. quadridentata* (mastax y estómago). Jiang *et al.* (2017) describe la acumulación de mercurio en *B. plicatilis* (hígado, riñón, gónada, músculo y estómago) utilizando AIEgen como sonda fluorescente. Según los resultados obtenidos en las pruebas de fluorescencia (Figura 12) y según lo observado por Alvarado-Flores *et al.* (2012); Alvarado-Flores y Rico-Martínez 2017) y Jiang *et al.* (2017), el estómago es el principal órgano donde se acumulan los metales. En la Figura 12aC se modificaron el contraste y brillo y se observan puntos fluorescentes en todo el cuerpo de *E. dilatata*, esto sugiere que puede ser calcio, estos puntos no se observan cuando se agregaron los metales y se confirma lo observado por Hernández-Ruiz *et al.* (2016) quienes observaron una descalcificación en *L. quadridentata* y *B. calyciflorus* cuando se intoxicaron con cromo.

Los valores reportados para *E. dilatata* en este trabajo son similares a los reportados en la literatura. Las proporciones de CL50 de *E. dilatata* a otras especies de rotíferos para Cu tienen un rango de 7 a 54 µg/L para *Brachionus calyciflorus* y *Brachionus patulus*

respectivamente, mostrando una mayor sensibilidad *E. dilatata* (Figura 21), en cambio para Fe es menos sensible en promedio en un factor de 3 (Figura 23). Burbank y Snell (1994) reportan una CL50 de 0.60 µg/L de Hg para *Brachionus calyciflorus* seis veces menos que la concentración para *E. dilatata* (Figura 25). Sin embargo, el Ni produce efectos letales en *E. dilatata* a 389 µg/L, a diferencia de los resultados de Snell *et al.*, (1991) para *Brachionus calyciflorus* (4000 µg/L) (Figura 27). El rango de CL50 de Zn para diferentes especies de organismos de rotíferos es variables va desde 154.4 µg/L para *Lecane inermis* hasta 2270 µg/L para *Brachionus havanaensis*, El valor de CL50 para *E. dilatata* (101 µg/L) es cercano al de *L. inermis*, pero 22 veces menor al de *B. havanaensis* (Figura 29).

Los valores de CE50 "r" para *E. dilata* están en general en el rango de los de la literatura científica para cladóceros y rotíferos. Mu *et al.* (2014) reportan un valor de CE50 = 21.54 µg/L y 9.21 µg/L de Hg para *Brachionus calyciflorus* y *Ceriodaphnia dubia* respectivamente y De Coen *et al.* (1998) reportan una CE 50 = 60 µg/L para *Daphnia magna*, estos resultados son mayores que el CE50 de *E. dilatata* (1.95 µg/L) (Figura 26). La CE50 "r" para *E. dilatata* es de 129.9 µg/L de Ni, muy similar al resultado de Mu *et al.* (2014) para *D. magna* (CE50 = 127.11 µg/L) (Figura 28).

Los resultados de la evaluación de la Inhibición de la tasa ingestión (IIng) con *E. dilatata* muestran que es más sensible que la prueba de reproducción en las Figuras 21, 23, 25, 27, 29 podemos observar la sensibilidad de la prueba de Inhibición de la ingestión comparada con otras especies planctónicas con cada uno de los metales estudiados.

Luego de una exposición de 24 h con el valor de LOEC respectivo para cada metal, la acumulación de *E. dilatata* tiene el siguiente patrón de mayor a menor concentración: Zn > Fe > Ni > Cu > Hg, al compararlo con otras especies de rotíferos encontramos diferencias en el patrón de acumulación: *Asplanchna sieboldii*, Fe > Cu > Zn > Ni, *Brachionus calyciflorus*, Fe > Cu > Zn > Ni, *Brachionus cf. diversicornis*, Fe > Zn > Ni > Cu, y *Brachionus falcatus*, Fe > Zn > Ni > Cu (Cuadro 9). La acumulación de Cu en *E. dilatata* (4.79 µg/g) es similar a los

**Cuadro 9.** Concentración de metal en diferentes especies.

Especie	µg/g	Referencia	Especie	µg/g	Referencia
<b>Cu</b>			<b>Ni</b>		
<i>Asplanchna sieboldii</i>	85.6	Woelfl <i>et al.</i> , 2016	<i>Asplanchna sieboldii</i>	74	Woelfl <i>et al.</i> , 2016
<i>Asplanchna sp.</i>	4.9	Woelfl <i>et al.</i> , 2016	<i>Asplanchna sp.</i>	16.7	Woelfl <i>et al.</i> , 2016
<i>Bosmina longispina</i>	26	Tulonen <i>et al.</i> , 2006	<i>Brachionus calyciflorus</i>	7.8	Woelfl <i>et al.</i> , 2016
<i>Brachionus calyciflorus</i>	11.2	Woelfl <i>et al.</i> , 2016	<i>Brachionus cf. diversicornis</i>	14.2	Woelfl <i>et al.</i> , 2016
<i>Brachionus cf. diversicornis</i>	5.7	Woelfl <i>et al.</i> , 2016	<i>Brachionus falcatus</i>	12.2	Woelfl <i>et al.</i> , 2016
<i>Brachionus falcatus</i>	5.3	Woelfl <i>et al.</i> , 2016	<i>Euchlanis dilatata</i>	13.36	Este trabajo
<i>Euchlanis dilatata</i>	4.79	Este trabajo	<i>Philodina sp</i>	8.5	Woelfl <i>et al.</i> , 2016
<i>Keratella cochlearis</i>	53	Tulonen <i>et al.</i> , 2006	<i>Paramecium caudatum</i>	1479.7	Este trabajo
<i>Paramecium caudatum</i>	234.3	Este trabajo			
<i>Philodina sp.</i>	6.9	Woelfl <i>et al.</i> , 2016			
<b>Fe</b>			<b>Zn</b>		
<i>Asplanchna sieboldii</i>	1670	Woelfl <i>et al.</i> , 2016	<i>Asplanchna sieboldii</i>	64.2	Woelfl <i>et al.</i> , 2016
<i>Asplanchna sp.</i>	167	Woelfl <i>et al.</i> , 2016	<i>Asplanchna sp.</i>	33.6	Woelfl <i>et al.</i> , 2016
<i>Brachionus calyciflorus</i>	230	Woelfl <i>et al.</i> , 2016	<i>Bosmina longispina</i>	432	Tulonen <i>et al.</i> , 2006
<i>Brachionus cf. diversicornis</i>	181	Woelfl <i>et al.</i> , 2016	<i>Brachionus calyciflorus</i>	29.9	Woelfl <i>et al.</i> , 2016
<i>Brachionus falcatus</i>	282	Woelfl <i>et al.</i> , 2016	<i>Brachionus cf. diversicornis</i>	32.7	Woelfl <i>et al.</i> , 2016
<i>Euchlanis dilatata</i>	144.3	Este trabajo	<i>Brachionus falcatus</i>	56.8	Woelfl <i>et al.</i> , 2016
<i>Philodina sp</i>	1250	Woelfl <i>et al.</i> , 2016	<i>Ceriodaphnia quadrangula</i>	258	Tulonen <i>et al.</i> , 2006
<i>Paramecium caudatum</i>	44721	Este trabajo	<i>Euchlanis dilatata</i>	372.8	Este trabajo
			<i>Keratella cochlearis</i>	145	Tulonen <i>et al.</i> , 2006
<b>Hg</b>			<i>Philodina sp</i>	33.5	Woelfl <i>et al.</i> , 2016
<i>Daphnia magna</i>	4	Enserink <i>et al.</i> , 1991	<i>Paramecium caudatum</i>	16337.3	Este trabajo
<i>Euchlanis dilatata</i>	1.02	Este trabajo			
<i>Paramecium caudatum</i>	7.45	Este trabajo			

valores de *B. cf. diversicornis* (5.7 µg/g) y *B. falcatus* (5.3 µg/g), el intervalo de acumulación de Fe en las diferentes especies de rotíferos es de 181-1670 µg/g y el valor de *E. dilatata* (144.3 µg/g) está dentro del intervalo. Enserink *et al.*, (1991) reportaron una acumulación de Hg de 4 µg/g para *D. magna* esto es 5 veces más que lo observado en *E. dilatata* (1.02 µg/g). La acumulación de Ni es muy similar entre las especies *B. cf. diversicornis* (14.2 µg/g), *B. falcatus* (12.2 µg/g) y *E. dilatata* (13.36 µg/g). El intervalo de concentración más alto entre rotíferos y cladóceros lo presentó el Zn de 29.9 (*B. calyciflorus*) a 432 µg/g (*Bosmina longispina*), el valor de *E. dilatata* fue el segundo más alto (372.8 µg/g) (Cuadro 6 y 9).

Enserink *et al.* (1991) determinaron valores de BCF para *D. magna* con el siguiente patrón decreciente, Hg> Zn> Cu> Ni, siendo éste diferente al encontrado con *E. dilatata* Cu> Zn> Hg> Fe> Ni, por lo tanto, solo coinciden en Ni con el BCF más bajo (54,98) respectivamente. El rango de BCF registrado para *E. dilatata* (Cuadro 6) fue de 54.95 (Ni) a 3189 (Zn) por lo tanto, según la Comisión Europea (1996) se recomienda que un BFC > 100 incluyendo metales sea clasificado como posiblemente peligroso.

### 8.3 *Paramecium caudatum*

En relación con CL50, Hg es el metal más tóxico para *P. caudatum*, seguido por Cu. El orden de toxicidad de los metales probados es  $Hg > Cu > Ni > Zn > Fe$ . Comparando los valores de CL10, Hg también es el más tóxico (Cuadro 4). En términos de CCL, *P. caudatum* fue más sensible a Hg, de acuerdo con la  $CCC_{IFV}$  fue más sensible a Cu de acuerdo con la  $CCC_{\%IC}$  es Ni (Cuadro 7).

El mecanismo de toxicidad del metal observado a través de los valores agudos y crónicos muestra que *P. caudatum* reduce su tasa de inhibición de vacuolas a concentraciones bajas de Cu y Hg (Cuadro 3). Sin embargo, el efecto sobre la reproducción se observa a concentraciones cercanas o superiores a los valores de CL50 (Cuadro 3). Rehman *et al.* (2010) sugieren que *P. caudatum* podría eliminar metales del medio después de 96 horas de incubación, Shakoori *et al.* (2004), Madoni y Romeo (2006) y Rehman *et al.* (2008, 2009) han reportado protozoos resistentes a los metales en aguas residuales y ambientes contaminados por metales.

El uso del colorante Phen Green permite determinar la velocidad de concentración de los metales. Después de 1 h de exposición:  $Hg > Fe = Ni = Zn = Cu$ . Al exponerlo 24 h, Cu fue el más lento en acumularse:  $Hg > Fe = Ni = Zn > Cu$ , estudios reportan que los ciliados son más sensibles a Cu y su concentración se ve menos eficiente que en otros microorganismos (Díaz *et al.*, 2006; Abraham *et al.*, 2017). Hg es el metal que más rápido se acumula y el más tóxico, Soto *et al.* (2018) encontraron que los protistas incorporan Hg pasivamente desde la fase disuelta y activamente a través del consumo y / o la unión del picoplancton portador de Hg y que las características morfológicas de los protistas como la superficie celular probablemente favorecen la absorción de Hg. Los metales Fe, Ni y Zn se concentraron a la misma velocidad en los dos tiempos de exposición, Fe y Zn fueron los menos tóxicos, la tolerancia de los ciliados a Zn tal vez se explique porque las MTs (Metalotioneínas) pueden ser también inducida por Zn (Díaz *et al.*, 2006; Somasundaram *et al.*, 2018). En presencia de metales la expresión de genes MT se incrementa, ayudando a la detoxificación (Martín-González *et al.*, 2006; Somasundaram *et al.*, 2018).

Los ciliados expuestos a metales pierden su integridad morfológica (redondeándose) (Pudpong y Chantangsi, 2015) y sus movimientos se ralentizan (Wanick *et al.*, 2008).

También pueden mostrar vacuolización intracelular, deformidades morfológicas y ruptura celular después de la acumulación de metales (Pudpong y Chantangsi, 2015, Madoni y Romeo 2006). Mediante el PG observamos vacuolización del citoplasma en *P. caudatum* expuesto 1h a Cu y a 24h a Fe. Al exponerlo a Hg durante 1 h, 24 h y a Ni 24h se observa gránulos fluorescentes en el citoplasma, posiblemente los gránulos consistan en complejos formados por los cationes metálicos y metalotioneínas (Abraham *et al.*, 2017) estos gránulos se forman dentro de pequeñas vacuolas, al extenderse más o menos de forma uniforme la vacuola original desaparece y son prueba de la acumulación del metal en el ciliado (Martín-González *et al.*, 2006). *P. caudatum* conserva su forma al exponerlo a 1h a Zn, se observan vacuolas que podrían contener el metal, al exponerlo 24 h se observan también pequeñas vacuolas. La exposición de los ciliados a metales forma vacuolas citoplasmáticas que contienen partículas densas en electrones. La acumulación de metales en gránulos y vesículas encerradas en membranas está muy extendida en numerosos filos, desde protozoos hasta mamíferos (Martín-González *et al.*, 2006; Abraham., 2017).

Al comparar los valores de CL50 de Cu para *P. caudatum* con otras especies de ciliados encontrados que *P. caudatum* es muy sensible (CL50 = 11.7 µg/L), Abraham *et al* (2017) reportan CL50 = 100 µg/L para *Pseudourostyla sp.* y *Tetmemena sp.*, CL50 = 200 µg/L, 700 µg/L, 1910 µg/L para *Euplotes sp.*, *Notohymena sp.* y *Bresslauides sp.* respectivamente, ciliados como *Colpoda steinii* ( CL50 = 8100 µg/L) y *Colpoda elongata* (CL50 = 13300 µg/L) son muy tolerantes a Cu pues requieren concentraciones altas de metal para que tengan efectos letales (Díaz *et al.*, 2006) (Figura 21). *Spirostomum teres* (CL50 = 170 µg/L) es más sensible a Ni, pues requiere la mitad de la concentración para tener efectos letales que *P. caudatum* (CL50 = 349.6 µg/L), sin embargo *P. caudatum* es más sensible que otros ciliados como *Pseudourostyla sp.* que es 14 veces menos sensible o *Euplotes patella* que es 20 veces menos sensible (Figura 27). *P. caudatum* es más sensible a Zn que otras especies de ciliados, ya que su CL50 es de 742 µg/L, Gong *et al.* (2014) reportó una CL50 de 973 µg/L valores muy cercanos, Abraham *et al.* (2017) reportó las CL50 para *Pseudourostyla sp.* (74600 µg/L), *Euplotes sp.* (124200 µg/L) y para *Tetmemena sp.* (144300 µg/L), 100, 167 y 194 veces más respectivamente que la CL50 para *P. caudatum* (Figura 29).

Los valores de CE50 de Cu para la prueba de Inhibición del crecimiento (%IC) para *P. caudatum* es de 72.9 µg/L, valor cercano a *Selenastrum capricornutum* CE50 = 50 µg/L reportado por Bartlett *et al.*, (1974), a *Pseudokirchneriella subcapitata* reportado por Berrebaan, *et al.* (2018) y a *Scenedesmus acuminatus* CE50 = 170 µg/L reportado por Magdaleno *et al.* (2013), el valor de la prueba de Inhibición de la formación de vacuolas es de CE50<sub>IFV</sub> = 4.72 µg/L por lo que esta prueba es más sensible (Figura 22). Santos-Medrano y Rico-Martínez (2015) reportaron para cladóceros y rotíferos CE50 = 9 µg/L, 20 µg/L, 30 µg/L, 50 µg/L para *Daphnia cf. prolata*, *Asplanchna brightwellii*, *Daphnia magna* y *Brachionus calyciflorus* respectivamente, comparando con los valores de *P. caudatum* CE50<sub>%IC</sub> = 1647 µg/L y CE50<sub>IFV</sub> = 1268 µg/L, este es muy tolerante a Fe (Figura 24). Los valores de CE50 = 390 µg/L de Hg para *Chlamydomonas reinhardtii*, CE50 = 440 µg/L para *Chlorella pyrenoidosa* (Li *et al.*, 2012) y CE50 = 426 µg/L para *Pseudokirchneriella subcapitata* (Berrebaan, *et al.*, 2018) son muy similares a el valor de CE50<sub>%IC</sub> = 366.3 µg/L para *P. caudatum*, con respecto al valor de CE50<sub>IFV</sub> = 3.8 µg/L, podemos decir que esta prueba es más sensible a Hg (Figura 26). *Ceriodaphnia dubia* es más sensible a Ni que *P. caudatum* con un valor de CE50 = 20.5 µg/L (Keithly *et al.*, 2004), *Chlorella sp.* es más tolerante a Ni que *P. caudatum* presenta un valor de CE50 = 1430 µg/L (Deleebeeck *et al.*, 2009), los valores para *P. caudatum* CE50<sub>%IC</sub> = 66.9 µg/L y CE50<sub>IFV</sub> = 239 µg/L (Figura 28). Los valores de CE50<sub>IFV</sub> = 327 µg/L y CE50<sub>%IC</sub> = 547 µg/L para Zn son muy cercanos, en la Figura 30 observamos especies más sensibles como *Daphnia cf. prolata* (CE50 = 20 µg/L) (Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2015) y más tolerantes como *Brachionus calyciflorus* (CE50 = 2150 µg/L) (Jawecki *et al.*, 2011).

Se ha utilizado microscopía de fluorescencia para estudiar los efectos que los metales tienen sobre los ciliados. La acumulación es un mecanismo de resistencia a metales común en los ciliados, una técnica para estudiarla es la microscopía de fluorescencia (Gutiérrez *et al.*, 2003). Martín-González *et al.* (2006) detectaron la bioacumulación de metales en *Drepanomonas revoluta*, *Uronema nigricans* y *Euplotes sp.* mediante microscopía de fluorescencia y microscopía de transmisión por electrones. Para la microscopía de fluorescencia usaron dos fluoróforos: TSQ [N-(6-methoxy-8-quinoly)-p-toluenesulfonamide] (Molecular Probes) es selectivo para Zn, y el fluoróforo bis-BTC [tetra-

ammonium salt] (Molecular Probes) el cual se une a Cd. Dias y Lima (2002) utilizaron tintes extraídos del kit de ensayo de viabilidad/citotoxicidad Live/Dead® (Molecular Probes Europe BV, Países Bajos) para observar los cambios morfológicos de *T. pyriformis* al exponerlo a Cu y Zn.

#### 8.4 *Moina macrocopa*

En relación con la CL50, *M. macrocopa* es más sensible a Hg. El orden de toxicidad es  $Hg > Cu > Zn > Ni > Fe$ , se requieren concentraciones muy altas de Zn, Ni y Fe para que se presenten efectos letales. Al comparar los valores de CL10, Hg también es el metal más tóxico. La competencia de los metales con los iones esenciales, como Ca, Mg y Na, por los sitios de absorción y el estrés oxidativo a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) son los principales mecanismos de toxicidad por metales en los crustáceos acuáticos. Los efectos secundarios de estos mecanismos en las células, tejidos y órganos equivalen a toxicidad, como la letalidad (Lari, *et al.*, 2017). El valor de CL50 de Cu para *M. macrocopa* (CL50 = 40.12  $\mu\text{g/L}$ ) es 2.5 veces mayor que los valores para *Daphnia obtusa* (CL50 = 11.7  $\mu\text{g/L}$ , Gaete y Chávez, 2008) y *Diaphanosoma brachyurum* (CE50 = 16.4  $\mu\text{g/L}$ , Mano *et al.*, 2011), pero al compararlo con otras especies como rotíferos y ciliados es más sensible, por ejemplo el valor de *M. macrocopa* es 5 veces menor que el valor de CL50 = 200  $\mu\text{g/L}$  para *Brachionus calyciflorus* y *Brachionus patulus* (Couillard, 1989, Hawryshyn y Mackay, 1979 respectivamente), 17 veces menor que el valor de *Notohymena* CL50 = 700  $\mu\text{g/L}$  (Abraham *et al.*, 2017) y 47.6 veces menor que el valor de *Bresslauides* CL50 = 1910  $\mu\text{g/L}$  (Pudpong y Chantangsi, 2015) (Figura 21). *M. macrocopa* es muy tolerante a Fe, su valor de CL50 = 3060.7  $\mu\text{g/L}$  (Figura 23). Li *et al.* (2012) reportó valores de CL50 para las algas *Chlamydomonas reinhardtii* CL50 = 1460  $\mu\text{g/L}$ , *Scenedesmus obliquus* CL50 = 2150, y *Chlorella pyrenoidosa* CL50 = 4830  $\mu\text{g/L}$ , *M. macrocopa* es más sensible a Hg su valor de CL50 = 9.57 (Figura 25). Wong (1992) reporta un valor de CL50 = 23590  $\mu\text{g/L}$  de Ni para *M. macrocopa*, nuestro valor de CL50 = 2878  $\mu\text{g/L}$ , 8 veces menor, de acuerdo a la literatura consultada *Spirostomum teres* CL50 = 170  $\mu\text{g/L}$  (Madoni, 2000) es el organismo más sensible a Ni, 17 veces menor que *M. macrocopa* (Figura 27). Los cladóceros *Daphnia obtusa* CL50 = 6.1  $\mu\text{g/L}$  (Gaete y Chávez, 2008) y *Diaphanosoma brachyurum* CL50 = 253.4  $\mu\text{g/L}$  (Mano *et al.*, 2011) son más sensibles a Zn, los cladóceros *Daphnia cf. prolata* CL50 = 1250

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

$\mu\text{g/L}$  (Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2015) y *Moina macrocopa*  $\text{CL}_{50} = 2040 \mu\text{g/L}$  (Wong, 1992), estos valores son cercanos al valor de *M. macrocopa*  $\text{CL}_{50} = 1457 \mu\text{g/L}$  (Figura 29).

Con respecto a la  $\text{CE}_{50}$  el metal más tóxico es Hg, el orden de toxicidad es  $\text{Hg} > \text{Cu} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Fe}$ . El valor de  $\text{CE}_{50}$  de Cu para *M. macrocopa* es de  $27.5 \mu\text{g/L}$ , Ferrando y Andreu (1993) reportan un valor de  $\text{CE}_{50} = 10 \mu\text{g/L}$  para *Daphnia magna* y Cowgill y Milazzo (1991) reportan un valor de  $\text{CE}_{50} = 357 \mu\text{g/L}$  para *Ceriodaphnia dubia* (Figura 22). En el caso de los cladóceros, la sensibilidad es muy variada, y depende principalmente de las condiciones el medio (Gutiérrez y Gagneten, 2011). *M. macrocopa* es más tolerante a Fe ( $\text{CE}_{50} = 1468 \mu\text{g/L}$ ) que *Daphnia cf. prolata*  $\text{CE}_{50} = 9 \mu\text{g/L}$  (Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2015) y *Daphnia magna*  $\text{CE}_{50} = 30 \mu\text{g/L}$  (Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2015) (Figura 24). *M. macrocopa* es el segundo organismo más sensible a Hg tiene un valor de  $\text{CE}_{50} = 0.083 \mu\text{g/L}$ , 111 veces menos que *Ceriodaphnia dubia*  $\text{CE}_{50} = 9.21 \mu\text{g/L}$  (Mu *et al.*, 2014) (Figura 26). El Hg tiene efecto sobre la reproducción, Khangarot y Das (2009) estudiaron la inhibición del desarrollo de huevos partenogénéticos de *Daphnia carinata*. *M. macrocopa* es más tolerante a Ni,  $\text{CE}_{50} = 219.26 \mu\text{g/L}$ , comparándola con *Ceriodaphnia dubia*  $\text{CE}_{50} = 20.5 \mu\text{g/L}$  (Keithly *et al.*, 2004) este valor 10 veces menos que el valor de *M. macrocopa* (Figura 28). El valor de  $\text{CE}_{50}$  de *M. macrocopa* es de  $49.28 \mu\text{g/L}$  de Zn, *Daphnia cf. prolata*  $\text{CE}_{50} = 20 \mu\text{g/L}$  (Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2015) estos valores son cercanos, otras especies son más tolerantes a Zn (Figura 30). En los cladóceros el Zn, a nivel celular altera el balance de Ca, ocasionando daños embrionarios, en el desarrollo o el crecimiento. A nivel reproductivo, la toxicidad actúa inhibiendo la eclosión de los huevos en la cámara incubatriz, por la disminución en la fecundidad de las hembras (Gutiérrez y Gagneten, 2011).

## 8.5 Distribución de Sensibilidad de Especies (DSE)

La DSE para datos agudos de Cu muestra que el valor de la concentración peligrosa para el 5% de las especies (H5) es muy cercano al valor de CL50 de *E. dilatata*, por lo que es el organismo más sensible de 20 especies utilizadas, *P. caudatum* es el segundo organismo más sensible, *M. macrocopa* está por debajo de la concentración peligrosa para el 50% de las especies (H50), *N. oculata* es una de las especies más tolerantes a Cu junto con las especies de ciliados (Figura 21). Para la construcción de DSE de los valores crónicos se utilizaron 14 especies. *Euchlanis dilatata* es la especie más sensible, el valor de CE50<sub>IIng</sub> se encuentra por debajo del valor de H5, *P. caudatum* (CE50<sub>IFV</sub>) es el segundo organismo más sensible, *M. macrocopa* se encuentra por debajo del valor H50, *N. oculata* es tolerante a Cu, podemos observar en la gráfica que las especies de algas son más tolerantes a Cu (Figura 22).

*E. dilatata*, *P. caudatum*, *M. macrocopa* y *N. oculata* son las especies más tolerantes para Fe, en la DSE aguda se utilizaron 12 especies, el rotífero *Lecane inermis* (Klimek *et al.*, 2013) es el organismo más sensible (Figura 23). Con respecto a los datos crónicos, *E. dilatata*, *P. caudatum*, *M. macrocopa* y *N. oculata* también son las más tolerantes, se encuentran por arriba del valor de H50. El cladóceros *Daphnia cf. prolata* (Santos-Medrano y Rico-Martínez, 2015) es la especie más sensible y el alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Arbilda *et al.*, 2016) es la menos sensible (Figura 24).

En la Figura 25 observamos la DSE aguda para Hg, *E. dilatata* es el segundo organismo más sensibles a Hg de 9 especies utilizadas para la DSE, seguido se encuentra *P. caudatum* y *M. macrocopa*. El rotífero *Brachionus calyciflorus* (Burbank y Snell, 1994) es la especie más sensible, *N. oculata* y otras especies de algas son los organismos más tolerantes a Hg. La Figura 26 muestra 13 especies en la DSE crónica para Hg, *E. dilatata* (CE50<sub>IIng</sub>) es la especie más sensible, seguida de *M. macrocopa*. *N. oculata* y *P. caudatum* se encuentran por arriba del valor de H50, en la gráfica de observa que las especies de algas son las más tolerantes a Hg.

*P. caudatum* es el segundo organismo más sensible a Ni de 16 especies utilizadas para la DSE aguda, *E. dilatata* y *M. macrocopa* se encuentran por debajo del valor de H50, *N. oculata* es muy tolerante a Ni. El ciliado *Spirostomum teres* (Madoni, 2000) es la especie más sensible, muy cercano al valor de H5, el ostrácodo *Stenocypris mayor* (Shuhaimi-

Othman *et al.*, 2014)) es la especie más tolerante (Figura 27). En lo que respecta a la DSE crónica, *E. dilatata* (CE50<sub>IIIng</sub>) es la especie más sensible de 13 especies, *E. dilatata* (CE50<sub>r''</sub>) y *P. caudatum* (CE50<sub>%IC</sub>) se encuentran por debajo del valor de H50, *N. oculata* es la especie menos sensible (Figura 28).

La gráfica 29 muestra la DSE aguda para Zn, está formada por 22 especies y *E. dilatata* es el segundo organismo más sensible, *P. caudatum* y *M. macrocopa* se encuentran en la parte central de la gráfica, *N. oculata* es tolerante a Ni, aunque los ciliados son los organismos menos sensibles. El cladócero *Daphnia obtusa* (Gaete y Chávez, 2008) es la especie más sensible. Con respecto a la DSE crónica *E. dilatata* (CE50<sub>IIIng</sub>) es la especie más sensible de 17, es la especie más cercana al valor de H5. *M. macrocopa*, *E. dilatata* (CE50<sub>r''</sub>) y *P. caudatum* (CE50<sub>IFV</sub>) se encuentran por debajo del valor de H50. El alga *N. oculata* es menos sensible, de acuerdo a la gráfica las especies de algas son las más tolerantes a Zn (Figura 30).

## 9. Conclusión

Se realizaron pruebas agudas y crónicas de cuatro metales traza (Cu, Fe, Ni, Zn) y uno no traza (Hg) con al alga *N. oculata*, el rotífero *E. dilatata*, el ciliado *P. caudatum* y el cladóceros *M. macrocopa*. Este trabajo integró resultados de FBC, acumulación y mecanismos de absorción de los cinco metales en el rotífero *E. dilatata* y el ciliado *P. caudatum*; mejoró nuestra comprensión del conocimiento sobre: a) los Mecanismos de Toxicidad, b) Bioconcentración y c) Cargas Corporales. En *E. dilatata* el metal ingresa por medio de la filtración, llega al estómago y de este modo llega al vitelario, mastax, vejiga, trofos y retractores laterales. En *P. caudatum* el metal ingresa al filtrar, formándose vacuolas. La combinación de pruebas agudas y crónicas y la determinación de FBC para cada metal permitió el cálculo de las cargas corporales agudas y crónicas que constituyen un vínculo entre la concentración de cada metal que ingresa al organismo y los efectos adversos causados por cada metal. Los resultados de FBC mostró que en el rotífero el metal que más se acumuló fue Cu (1987.5) y en el ciliado fue Hg (31900). Las cargas corporales letales y crónicas confirmaron que Cu y Hg son los metales más tóxicos, para *E. dilatata* (Cu CCL = 7.35 µg/g, CCC = 0.31 µg/g, Hg CCL = 3.76 µg/g, CCC = 0.065 µg/g) y *Paramecium caudatum* (Cu CCL = 182.3 µg/g, CCC = 73.5 µg/g, Hg CCL = 178.6 µg/g, CCC = 121.2 µg/g).

Se realizaron dos pruebas crónicas con *Euchlanis dilatata*: la tasa intrínseca de crecimiento “*r*” y la tasa de Inhibición de la Ingestión. Nuestros resultados sugieren que el rotífero selecciona su alimentación evitando las partículas más tóxicas y reduciendo los efectos adversos sobre la reproducción, hasta que la mortalidad *per se* reduce la reproducción. El efecto crónico sobre la tasa de ingestión fue muy sensible para todos los metales, mientras que la reproducción se vio ligeramente afectada. Con *Paramecium caudatum* también se realizaron dos pruebas crónicas: % de Inhibición del crecimiento y la tasa de formación de vacuolas. Los resultados sugieren que la acumulación del metal en las vacuolas reduce los efectos tóxicos sobre la reproducción. El efecto crónico sobre la formación de vacuolas es sensible para Cu y Hg al compararla con otras especies.

El metal más tóxico para los cuatro organismos planctónicos es el Hg de los cinco metales utilizados en el trabajo. Este trabajo también incluyó un análisis de la distribución de la sensibilidad de las cuatro especies del zooplancton estudiadas: *N. oculata*, *E. dilatata*,

*P. caudatum* y *M. macrocopa*. Este análisis mostró que *E. dilatata* es el organismo más sensible a Cu en la prueba de mortalidad y el más sensible a Cu, Ni y Zn en la prueba crónica(11ng), es el segundo organismo más sensibles a Hg y Zn en la prueba de mortalidad, sólo debajo de *Brachionus calyciflorus* y *Daphnia obtusa* respectivamente. Este análisis también mostró que *N. oculata* es tolerante a los cinco metales probados. De acuerdo con todos resultados obtenidos el rotífero *E. dilatata* puede considerarse un buen organismo de prueba en bioensayos de toxicidad debido a sus características biológicas, su relevancia ecológica y su gran sensibilidad a los metales.



## 10. Referencias

- Abraham, J. S., Sripoorna, S., Choudhary, A., Toteja, R., Gupta, R., Makhija, S., Warren, A. 2017. Assessment of heavy metal toxicity in four species of freshwater ciliates (Spirotrichea: Ciliophora) from Delhi, India. *Current Science*. 113(11): 2141-2150. DOI: 10.18520/cs/v113/i11/2141-2150
- Ahmad, M., Islam, S., Rahman, M., Haque, M., Islam, M. 2010. Heavy Metals in Water, Sediment and Some Fishes of Buriganga River, Bangladesh. *International Journal of Environmental Research*. 4(2): 321-332. DOI: 10.22059/ijer.2010.24
- Alvarado-Flores J, Rico-Martínez R, Ventura-Juárez J, Silva-Briano M, Rubio-Franchini I. 2012. Bioconcentration and localization of lead in the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas 1677 (Rotifera: Monogononta). *Aquatic Toxicology*. 109: 127-32. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.12.007
- Alvarado-Flores, J., Rico-Martínez, R. 2017. Bioconcentration of Lead and x-ray microanalysis with SEM in the freshwater rotifer *Lecane quadridentata* (Rotifera: Monogononta). *Polish Journal Environmental Studies*. 26(6): 2869–2872. DOI: 10.15244/pjoes/67331
- Arbildua, J., Villavicencio, G., Urrestarazu, P., Opazo, M., Brix, K., Adams, W., Rodriguez, P. 2016. Effect of Fe (III) on *Pseudokirchneriella subcapitata* at circumneutral pH in standard laboratory tests is explained by nutrient sequestration. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*. 36(4): 952-958. DOI: 10.1002/etc.3609
- Arias-Almedia, J. C. and Rico-Martínez, R. 2011. Toxicity of Cadmium, Lead, Mercury and Methyl Parathion on *Euchlanis dilatata* Ehrenberg 1832 (Rotifera: Monogononta). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 87: 138-142. DOI 10.1007/s00128-01-0308-x
- Arunakumara, K. K. I. U., Xuecheng, Z., Song, X. 2007. Comparative study on bioaccumulation of lead and cadmium by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

under laboratory conditions. *Ciencias Marinas*. 33(3): 271–280. DOI: 10.7773/cm.v33i3.1199

Arunakumara, K.K.I.U., Xuecheng, Z. 2008. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. *Journal of Ocean University of China*. 7: 60–64. DOI: 10.1007/s11802-008-0060-y

Ates, M., Cimen, I. C., Unal, I., Kutlu, B., Ertit Tastan, B., Danabas, D., Aksu, O., & Arslan, Z. 2020. Assessment of impact of  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on phytoplankton species *Selenastrum capricornutum* and *Nannochloropsis oculata*. *Environmental Toxicology*. 35(3): 385–394. DOI: 10.1002/tox.22875

Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality Volume 1. 2000. National Water Quality Management Strategy. Australian and New Zealand. Environment and Conservation Council. Agriculture and Resource. Management Council of Australian and New Zealand.

Barata, C., Markich, S. J., Baird, D. J., Soares, A. M. 2002. The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*. 61(3-4): 143-154. DOI: 10.1016/s0166-445x(02)00052-8.

Bartlett, L., Rabe, F. W., Funk, W. H. 1974. Effects of copper, zinc and cadmium on *Selenastrum capricornutum*. *Water Research*. 8: 179-185.

Berrebaan, I., Montassir, L., Alami, M.E., Saadallah, M., Bouchtaoui, S., Bessi, H. 2018. Applicability of Miniscale Algal Growth Inhibition Bioassay using Microtitration in the Central Moroccan Laboratory (ONEE). *Journal of Materials and Environmental Science*. 9(4): 1306-1311. DOI: 10.26872/jmes.2017.9.4.142

Blaise, C., Vasseur, P. 2005 Algal microplate toxicity test. In Blaise C, Féraud JF. (Eds.), *Small-scale freshwater toxicity investigations*. Springer Science & Business Media. 1: 137–179. Berlin: Springer.

Bogusław, K. M., Lenart-Boroń, M. A., Cupak, A. K., Wałęga, A. S. 2014. The evaluation of heavy metal content in water and sediments of small reservoirs in light of various

environmental quality regulations, Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering. 49(7): 827-832. DOI: 10.1080/10934529.2014.882645

Boyd, R. S. 2010. Heavy Metals Pollutants and Chemical Ecology: Exploring New Frontier. Journal of Chemical Ecology. 36: 46-58. DOI 10.1007/s10886-009-9730-5

Bryan, G.W., Langston, W. 1992. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. Environmental Pollution, 76 2, 89-131. DOI: 10.1016/0269-7491(92)90099-V

Burbank, S.E., Snell, T. W. 1994. Rapid toxicity assessment using esterase biomarkers in *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). Environmental Toxicology and Water Quality. 9: 171-178. DOI: 10.1002/tox.2530090303

Bury, N., Walker, P., Glover, C. 2003. Nutritive metal uptake in teleost fish. The Journal of experimental biology. 206: 11-23. DOI: 10.1242/jeb.00068.

Cairns, J. Jr., Buikema, A. L. Jr., Heath, A. G., Parker, B. C. 1978. Effects of temperature on aquatic organism sensitive to selected chemicals. Virginia water Resources Research Centre. Bull 106: 88.

Calow, P. 1994. Handbook of Ecotoxicology. Vol. I and II. London, U.K.: Blackwell Scientific Publications. 416 pp., J. 1986. Management of water quality and natural habitats to enhance both human and wildlife needs. Environmental Reperation II. Philadelphia-E.E.U.U. 86-99.

Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life. 2007. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Imidacloprid. In: Canadian environmental quality guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg.

Canli, M. 2005. The Transfer of Zinc in Two Linked Trophic Levels in Fresh Water and Its Effect on the Reproduction of *Daphnia magna*. Journal of Freshwater Ecology. 20: 269-276. DOI: 10.1080/02705060.2005.9664966.

CE-CCA-001/89.1989. Acuerdo por el que se establecen los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua. Diario Oficial de la Federación. México. 1989 (2 de diciembre).

Cempel, M., Nickel, G. 2006. Nickel: A Review of Its Sources and Environmental Toxicology. Polish Journal of Environmental Studies. 15(3): 375-382.

Clément, P., Amsellem, J., Cornillac, A.-M., Luciani, A., Ricci, Claudia. 1980. An Ultrastructural Approach to Feeding Behaviour in *Philodina Roseola* and *Brachionus Calyciflorus* (Rotifers) I. The Buccal Velum. Hydrobiologia. 73: 127-131. 10.1007/BF00019435.

Contreras Pérez, J., Mendoza Gómez, C., Gómez, A. 2004. Determinación de metales pesados en aguas y sedimentos del Río Haina. Ciencia y Sociedad. 29(1): 38-71. DOI: 10.22206/cys.2004.v29i1.pp38-71

Coogan, T.P., Latta, D.M., Snow, E.T., Costa, M. 1989. Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds. Critical Reviews in Toxicology. 19(4): 341-384. DOI: 10.3109/10408448909029327

Couillard, Y., Ross P., Pinel-Alloul B. 1989. Acute toxicity of six metals to the Rotifer *Brachionus calyciflorus*, with comparisons to other freshwater organisms. Toxicity Assessment. 4(4): 451-462. DOI: 10.1002/tox.2540040405

Covarrubias, S. A., y Peña Cabriales, J. J. 2017. Contaminación ambiental por metales pesados en México: problemática y estrategias de fitorremediación. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 33: 7-21. DOI: 10.20937/RICA.2017.33.esp01.01

Cowgill, U. M., Milazzo, D. P. 1991. Comparison of the effect of Metallic copper and Copper Nitrate ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) on *Ceriodaphnia dubia* Utilizing the Three-Brood Test. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 46: 141-145. DOI: 10.1007/bf01688267

Dahms, H.-U., Hagiwara, A., Lee, J.-S. 2011. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. Aquatic Toxicology. 101: 1-12. DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.09.006

Das, K.K., Das, S.N., Dhundasi, S.A. 2008. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. The Indian journal of medical research. 128(4): 412-425.

De Coen, W. M., Vangheluwe, M. L., Janssen, C. R. 1998. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing-III. Rapid toxicity testing of pure chemicals and sediment pore waters using ingestion and digestive enzyme activity. Chemosphere. 37(13): 2677-2694. DOI:10.1016/S0045-6535(98)00154-4

De Vitre R. R., Sulzberger, B., Buffle, J. 1994. Transformation of iron at redox boundaries. In Chemical and biological regulation of aquatic systems. CRC Press Inc. Departamento de Ecología y Ambiente. INTEVEP. PDVSA. Venezuela. 109pp.

Deleebeeck, N., De Laender, F., Chepurinov, V., Vyverman, W., Janssen, C., De Schamphelaere, K. 2009. A single bioavailability model can accurately predict Ni toxicity to green microalgae in soft and hard surface waters. Water research. 43: 1935-47. DOI: 10.1016/j.watres.2009.01.019.

Díaz, S., Martín-González, A., Gutiérrez, J. C. 2006. Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa. Environment international. 32(6): 711-717. DOI: 10.1016/j.envint.2006.03.004

Dimas, M.J.J., Garza, M. N.D., Treviño y, D. B. M. 2015. Índice de la calidad del agua y metales pesados del cauce aguas blancas del municipio de Acapulco Guerrero, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas [en línea]. 1:113-118[fecha de Consulta 25 de Mayo de 2020]. ISSN: 2007-0934. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=26313924301>

Dou, X., Lu, X. H., Lu, M. Z., Yu, L. S., Xue, R., Ji, J. B. 2013. The effects of trace elements on the lipid productivity and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata*. Journal Renewable Energy 2013:1-6. DOI: 10.1155/2013/671545

Eisler, R. 1993. Zinc hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. Washington, D.C.: U.S. Dept. of the Interior, Fish and Wildlife Service.

El-Bassat, R. A., Touliabah, H. E. and Harisa, G. I. 2012. Toxicity of four pharmaceuticals from different classes to isolated plankton species. *African Journal of Aquatic Science*. 37(1): 71-80. DOI: 10.2989/16085914.2012.666376

Elías-Gutiérrez, M. 1995. Notas sobre los cladóceros de embalses a gran altitud en el Estado de México, México. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, 40: 197–214.

Enesco, H. E., Wolanskyj, A., Sawada, M. 1989. Effect of copper on lifespan and lipid peroxidation in rotifers. *Age*. 12: 19-23. DOI: 10.1007/BF02432514

Enserink, EL., Mass-Diepeveen, J.L., Van Leeuwen, C. J. 1991. Combined effects of metals, an ecotoxicological evaluation. *Water Research*. 25(6): 679-687. DOI: 10.1016/0043-1354(91)90043-P

FEQGs. 2019. Federal Environmental Quality Guidelines-Iron. Canadian Environmental Protection Act, 1999. Federal Environmental Quality Guidelines.

Ferard, J.-F., Blaise, C. 2013. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*, Springer Science+Business Media Dordrecht. DOI: 10.1007/978-94-007-5704-2

Ferrando, M. D., Andreu, E. 1993. Feeding behavior as an index of copper stress in *Daphnia magna* and *Brachionus calyciflorus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 106C(2): 327-331. DO: 10.1016/0742-8413(93)90141-7

Flores, C. M., Del Angel, E., Frías, D. M., Gómez, A. L. 2018. Evaluación de parámetros fisicoquímicos y metales pesados en agua y sedimento superficial de la Laguna de las Ilusiones, Tabasco, México. *Tecnología y ciencias del agua*, 9(2):39-57. Disponible en: <<http://revistatyca.org.mx/ojs/index.php/tyca/article/view/1670>>. Fecha de acceso: 26 mayo 2020. DOI: 10.24850/j-tyca-2018-02-02.

Fogg, G. E. 1995. Some comments on picoplankton and its importance in the pelagic ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology*. 9: 33–39.

Furmanska, M. 1979. Studies of the Effect of Copper, Zinc and Iron on the Biotic Components of Aquatic Ecosystems. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*. 26: 213-220

Gaete, H., Chávez, C. 2008. Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (Cladóceras, Crustácea). *Limnetica*. 27(1): 1-10.

Garner, K.L., Suh, S., Lenihan, H.S., Keller, A.A. 2015. Species sensitivity distributions for engineered nanomaterials. *Environmental Science & Technology*. 49: 5753-5759.

Gerhardt, A. 1993. Review of impact of heavy metals on stream invertebrates with special emphasis on acid conditions. *Water, Air, and Soil Pollution*. 66: 289–314. DOI: 10.1007/BF0047

Gilbert, J. J., Starkweather, P. L. 1977. Feeding in the Rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Oecologia* 28:125-131. DOI: 10.1007/BF00345247

Golovanova, I. L. 2008. Effects of heavy metals on the physiological and biochemical status of fishes and aquatic invertebrates. *Inland Water Biology* 1: 93-101. DOI: 10.1007/s12212-008-1014-1

Gómez, L. L. M., Ramirez, C. Z. 2009. Microalgas como biomonitores de contaminación. *Revista de Ciencias Químicas*, Vol. XVI, Nº 2, 2004. La Habana, CU: Universidad de Oriente. Retrieved from <http://www.ebrary.com>

Gong, Z., Chen, Y., Yan, Y., Pei, S., Wu, D., Zhang, M., Wang, Q. 2014. Toxicity of Three Heavy Metal Pollutants of the Pharmaceutical Wastewater to *Paramecium Caudatum*. *Advanced Materials Research*. 937: 571-577. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.937.571

Guanzon, G. N., Nakahara, Jr. H., Yoshida Y. 1994. Inhibitory Effects of Heavy Metal on Growth and Photosynthesis of Three Freshwater Microalgae. *Fisheries Science*. 60(4): 379-384. DOI:10.2331/fishsci.60.379

Gutiérrez, J. C., Martín-González, A., Díaz, S., Ortega, Ruth. 2003. Ciliate as potential source of cellular and molecular biomarker/biosensors for heavy metal pollution. *European Journal of Protistology*. 39: 461-467. DOI: 10.1078/0932-4739-00021

Gutierrez, M. F. y Gagneten, A. M. 2011. Avances metodológicos y potencialidad de cladóceros y copépodos como organismos test. *Revista Peruana de Biología*. 18: 389-396.

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. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 27: 89-102.

Hassan, S. H. A., Ginkel, S. W. V., Hussein, M. A. M., Abskaron, R., Oh, S. E. 2016. Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensor. *Environment International*. 92-93: 106-118. DOI: 10.1016/j.envint.2016.03.003

Hawryshyn, C.W., Mackay, W. C. 1979. Toxicity and tissue uptake of methylmercury administered intraperitoneally to rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 23: 79-86.

Hazrat, A., Ezzat, K. 2018. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs-Concepts and implications for wildlife and human health. *Human and Ecological Risk Assessment* 25(6): 1353-1376. DOI: 10.1080/10807039.2018.1469398

Henry, L. 1988. Recomendaciones concernientes a la selección de organismos para bioensayos acuáticos.

[www.cepis.opsoms.org/eswww/fulltext/publica/orimuest/omnax51.html](http://www.cepis.opsoms.org/eswww/fulltext/publica/orimuest/omnax51.html)

Hernández-Flores, S., Rico-Martínez, R. 2006. Study of the effects of Pb and Hg toxicity using a chronic toxicity reproductive 5-day test with the freshwater rotifer *Lecane quadridentata*. *Environmental Toxicology*. 21(5): 533-540. DOI: 10.1002/tox.20218

Hernández-Ruiz, E., Alvarado-Flores, J., Rubio-Franchini, I., Ventura-Juárez, J., Rico-Martínez, R. 2016. Adverse effects and bioconcentration of chromium in two freshwater rotifer species. *Chemosphere*. 158: 107–115. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.05.067

Hobbs, D. A., Warne, M. St. J. y Markich, S. J. 2005. Evaluation of criteria used to assess the quality of aquatic toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1: 174-180. DOI: 10.1897/2004-003R.1

Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton, A. G. Jr., Cairns, J. Jr. (Ed). 2003. *Hanbook of Ecotoxicology*. Boca Raton, Florida. CRC Press.

Huaranga, M. F., Méndez, G. E., Quilcat, L. V., Huaranga, A. F. 2012. Contaminación por metales pesados en la Cuenca del Río Moche, 1980-2010, La Libertad-Perú. *Scientia Agropecuaria* 3: 235-247. Disponible en : <https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fwww.redalyc.org%2Farticulo.oa?id%3D357633703005>

Hydrosphere research. Learn More about Environmental Toxicity Testing. Disponible en: <https://www.hydrosphere.net/about-hydrosphere/learn-more-about-environmental-toxicity-testing/> Fecha de acceso: Jun 2020.

Illing, A. C., Shawki, A., Cunningham, C.L., Mackenzie, B. 2012. Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1. *Journal of Biological Chemistry*. 287(36): 30485-30496. DOI:10.1074/jbc.M112.364208

Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., Beeregowda, K. N. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*. 7(2): 60–72. DOI: 10.2478/intox-2014-0009.

Jannsen, C. R. and G. Persoone. 1993. Rapid toxicity screening tests for aquatic biota. 1. Methodology and experiments with *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 12: 711-717.

Jarüp, L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*. 68: 167-

82. DOI: 10.1093/bmb/ldg032

Jawecki, G., Szczyński, Ł., Solecka, D., Sawicki, J. 2011. Short ingestion tests as alternative proposal for conventional range finding assays with *Thamnocephalus platyurus* and *Brachionus calyciflorus*. *International Journal of Environmental Science*. 8(4): 687-694. DOI: 10.1007/BF03326253

Jeon, J., Ra, J. S., Lee, S., Lee, M., Yu, S., & Kim, Sang. 2010. Role of food and clay particles in toxicity of copper and diazinon using *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73. 400-6. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2009.10.011

Jeziorski, A., Yan, N. D. 2006. Species identity and aqueous calcium concentrations as determinants of calcium concentrations of freshwater crustacean zooplankton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 63: 1007-1013. DOI: 10.1139/F06-019

Jiang, Y., He, T., Chen, Y., Ruan, Y., Zhou, Y., Tang, B., Qin, J., Tang, Y. 2017. Quantitative evaluation and: In vivo visualization of mercury ion bioaccumulation in rotifers by novel aggregation-induced emission fluorogen nanoparticles. *Environmental Science Nano*. 4: 2186-2192. DOI: 10.1039/C7EN00599G.

Juárez-Franco, M. F., Sarma, S. S. S., Nandini, S. 2007. Effect of cadmium and zinc on the population growth of *Brachionus havanaensis* (Rotifera: Brachionidae). *Journal of Environmental Science and Health - Part A*. 42: 1489-1493. DOI: 10.1080/10934520701480938

Juchelka, C. M., Snell, T. W. 1994. Rapid toxicity assessment using rotifer ingestion rate. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 26: 549-554. DOI: 10.1007/BF00214160

Kagan, M. L., Matulka, A. 2015. Safety Assessment of the Microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Toxicology reports*. 2: 617-623. DOI: 10.1016/j.toxrep.2015.03.008

Keithly, J., Brooker, J. A., DeForest, D. K., Wu, B. K., Brix, K. V. 2004. Acute and Chronic Toxicity of Nickel to a Cladoceran (*Ceriodaphnia dubia*) and an Amphipod (*Hyalella*

*azteca*). Environmental Toxicology and Chemistry. 23(3): 691-696. DOI: 10.1897/02-630

Kenneth, W. and Seinen, W. 2010. Acute Toxicity and Lethal Body Burden of Endosulfan in Tilapia (*Oreochromis niloticus* (L)). The Open Environmental Pollution & Toxicology Journal. 2: 21-26. DOI: 10.2174/1876397901002010021

Khangerot, B. S., and Das, S. 2009. Toxicity of mercury on in vitro development of parthenogenetic eggs of a freshwater cladoceran *Daphnia carinata*. Journal of hazardous materials, 161(1): 68–73. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.03.068

King C. 1967. Food, Age, and the Dynamics of a Laboratory Population of Rotifers. Ecology 48(1): 111-128. DOI: 10.2307/1933423

Klaassen, C. D. and J. B. Watkins III. 2001. Manual de toxicología. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. 981 pp.

Klimek, B., Fiałkowska, E., Kocerba-Soroka, W., Fyda, J., Sobczyk, M., Pajdak-Stós, A. 2013. The toxicity of selected trace metals to *Lecane inermis* rotifers isolated from activated sludge. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology. 91(3): 330-3. DOI: 10.1007/s00128-013-1062-z

Kryuchkova, M., Danilushkina, A., Lvov, Y., Fakhrullin, R.F. 2016. Evaluation of toxicity of nanoclays and graphene oxide in vivo: a *Paramecium caudatum* study. Environmental science. Nano, 3: 442-452. DOI: 10.1039/C5EN00201J

Landis, W. G and Yu, Ming-Ho. 1999. Introduction to Environmental Toxicology. Impacts of Chemicals upon Ecological Systems. Boca Raton, FL. Lewis Publisher.

Lari, E., Gauthier, P., Mohaddes, E., Pyle, G. G. 2017. Interactive toxicity of Ni, Zn, Cu, and Cd on *Daphnia magna* at lethal and sub-lethal concentrations. Journal of hazardous materials, 334: 21–28. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.03.060

Li, M., Wan, C., Pan, X., Zou, Y., Chang, J., Xie, Ping. 2012. Acute toxic effects of zinc, cadmium, and mercury on the growths of three unicellular green microalgae with relatively high initial densities. Fresenius Environmental Bulletin. 21(6): 1349-1356.

Lide, D. R. 2003. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 84th edition, 2003-2004. Boca Raton, Florida. Lewis Publishers.

Luoma, S. N. 1983: Bioavailability of trace metals to aquatic organisms. Science of the Total Environment. 28: 1-22. DOI: 10.1016/s0048-9697(83)80004-7

Madoni P. and Romeo M. G. 2006. Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. Environmental Pollution. 141: 1-7. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.08.025

Madoni, P. 2000. The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. Environmental Pollution. 109(1): 53-59. DOI: 10.1016/S0269-7491(99)00226-2

Madoni, P., Esteban, G., and Gorbi G. 1992. Acute Toxicity of Cadmium, Copper, Mercury, and Zinc to Ciliates from Activated Sludge Plants. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 49: 900-905. DOI: 10.1007/BF00203165

Magdaleno, A., Vélez, C., Wenzel, M., Tell, G. 2013. Effects of Cadmium, Copper and Zinc on Growth of Four Isolated Algae from a Highly Polluted Argentina River. Bulletin of environmental contamination and toxicology. 92: 202-207. DOI: 10.1007/s00128-013-1171-8

Magesky, A., Pelletier, É. 2018 Molecular Stress Responses against Trace Metal Contamination in Aquatic Invertebrates. In: Asea A., Kaur P. (eds) Heat Shock Proteins and Stress. Heat Shock Proteins, vol 15. Springer, Cham DOI: 10.1007/978-3-319-90725-3\_11

Mancilla-Villa, O. R., Ortega-Escobar, H. M., Ramírez-Ayala, C., Uscanga-Mortera, E., Ramos-Bello, R., Reyes-Ortigoza, A. L. 2012. Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 28(1): 39-48.

Mano, H., Ogamino, Y., Sakamoto, Masaki., Tanaka, Y. 2011. Acute toxic impacts of three heavy metals (copper, zinc, and cadmium) on *Diaphanosoma brachyurum* (Cladocera: Sididae). Limnology. 12: 193-196. DOI: 10.1007/s10201-010-0338-9

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Martínez-Jerónimo F., Espinosa-Chávez F. y Villaseñor-Córdoba R. 2000. Effect of culture volume and adult density on the neonate production of *Daphnia magna*, as a test organism for aquatic toxicity test. *Environmental Toxicology*. 15: 155-159. DOI: 10.1002/1522-7278(2000)15:3<155::AID-TOX1>3.0.CO;2-X

Martínez-Jerónimo, F. and Gutiérrez-Valdivia, A. 1991. Fecundity, reproduction, and growth of *Moina macrocopa* fed different algae. *Hydrobiologia*. 222: 49-55. DOI: 10.1007/BF00017499

Martínez-Jerónimo, F., Rodríguez-Estrada, Jesús., Martínez-Jerónimo, Laura. 2008. *Daphnia exilis* Herrick, 1895 (Crustacea:Cladocera). Una especie zooplanctónica potencialmente utilizable como organismo de prueba en bioensayos de toxicidad aguda en ambientes tropicales y subtropicales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 24: 153-159.

Martínez-Tabche, L., Ramírez, M., German, F., Galar, C., Madrigal, M.,Ulloa, G., Orozco, F. 1997. Toxic effect of sodium dodecylbencensulfonate, lead, petroleum, and their mixtures on the activity of acetylcholinesterase of *Moina macrocopa* in vitro. *Environmental Toxicology and Water Quality*. 12: 211-215. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2256(1997)12:3<211::AID-TOX2>3.0.CO;2-B

Martín-González, A., Dias, S., Borniquel, S., Gallego, A., Gutierrez, J.C. 2006. Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. *Research Microbiology*. 157:108-118. DOI: 10.1016/j.resmic.2005.06.005

McCarty, L. 1986 The relationship between aquatic toxicity QSARs and bioconcentration for some organic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 5: 1071–1080. <https://doi.org/10.1002/etc.5620051207>

Miyoshi, N., Kawano, T., Tanaka, M., Kadono, T., Kosaka, T., Kunimoto, M., Takahashi, T., Hosoya, H. 2003. Use of Paramecium species in bioassays for environmental risk

management: Determination of IC<sub>50</sub> values for water pollutants. *Journal of Health Science*. 49: 429-435. DOI: 10.1248/jhs.49.429

Monteiro, C. M., Fonseca, S. C., Castro, P.M.L., Malcata, F. X. 2011. Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. *Journal of Applied Phycology*. 23: 97–103. DOI: 10.1007/s10811-010-9542-6

Mount, D. I. and Norberg, T. J. 1984. A seven-day lifecycle cladoceran toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 3: 425-434. DOI: 10.1002/etc.5620030307

Mu, Y., Wu, F., Chen, C., Liu, Y., Zhao, X., Liao, H., Giesy, J.P. 2014. Predicting criteria continuous concentrations of 34 metals or metalloids by use of quantitative ion character-activity relationships-species sensitive distribution (QICAR-SSD) model. *Environmental Pollution*. 188: 50-55. DOI: 10.1016/j.envpol.2014.01.011

Nalimova, A.A., Popova, V., Tsoglin, L., Pronina, N 2005. The Effect of Copper and Zinc on *Spirulina platensis* Growth and Heavy Metal Accumulation in Its Cell. *Russian Journal of Plant Physiology*. 52: 229-234. DOI: 10.1007/s11183-005-0035-4.

Nandini, S., Mayeli S. M. y Sarma, S. S.S. 2004. Effect of stress on the life table-demography of *Moina macrocopa*. *Hydrobiologia*, 526 (1): 245–254. DOI: 10.1023/B:HYDR.0000041597.96720.ff

Neiderlehner, B. R., Buikema, A. L. Jr., Pittinger, C. A., Cairns, J. Jr. 1984. Effects of cadmium on the population growth of a benthic invertebrate *Aeolosoma Headleyi* (oligochaeta). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 3: 255-262. DOI: 10.1002/etc.5620030208

Nelson, S. M. and Roline, R. A. 1998. Evaluation of the sensitivity of rapid toxicity tests relative to Daphnid acute lethality tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 60: 292-299. DOI: 10.1007/s001289900624

Nichols, H. W. 1973. Growth media-freshwater. In: Stein J. R. (ed). Handbook of physiological methods. Cambridge University Press, Cambridge, MA, pp 460

Nikinmaa, M. 2014. An introduction to aquatic toxicology. Amsterdam: Boston: Elsevier Academic Press. 240 pp

Nogrady, T., Wallace, R. L., Snell, T. W. 1993. Rotifera I: Biology, Ecology and Systematics. In Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world 4. SPB Academic Publishing. The Hague, The Netherlands. 142 pp.

NOM-001-Ecol-1996. Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales y bienes nacionales. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación 30 de abril 1997.

Okamoto, O., Pinto, E., Latorre, L., Bechara, E. Colepicolo, P., (2001). Okamoto OK, Pinto E, Latorre LR, Bechara EJH, Colepicolo P. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplast. Archives of environmental contamination and toxicology. 40: 18-24. DOI: 10.1007/s002440010144.

Omar, Hanan. 2002. Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. International Biodeterioration & Biodegradation - INT BIODETERIOR BIODEGRAD. 50:95-100. DOI: 10.1016/S0964-8305(02)00048-3.

Paul, D. 2017. Research on heavy metal pollution of river Ganga: A review. Annals of Agrarian. 15: 278-286. DOI: 10.1016/j.aasci.2017.04.001

Petrat, F., Rauen, U., de Groot, H. 1999. Determination of the chelatable iron pool of isolated rat hepatocytes by digital fluorescence microscopy using the fluorescent probe, Phen Green SK. Hepatology 29(4): 1171-9. DOI: 10.1002/hep.510290435

Posthuma, L., Suter II, G., Traas, T. (Ed). 2001. Species sensitivity distributions in ecotoxicology. Boca Raton, FL. CRC press. DOI: 10.1201/9781420032314

Pudpong, S., Chantangsi, C. 2015. Effects of Four Heavy Metals on Cell Morphology and Survival Rate of the Ciliate *Bresslauides sp.* Tropical Natural History. 15(2): 117-125.

Quintana, M. E. C., Sosa, C. M., Rubio, A. H., Puga, T. S., Quintana, M. G., Moreno, M., Alcalá, J. J. 2008. Comportamiento de la Contaminación por Plomo, Níquel y Vanadio en la Cuenca del Río Conchos. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales. 4(2): 68-76.

Quintana, M. R. M., Espinoza P. J. R., Frescas M. A. D., Pinedo, C. A. 2015. La importancia de la evaluación de la calidad del agua en la Laguna de Bustillos, Chihuahua, México. Revista Latinoamericana el Ambiente y las ciencias. 6(13): 187-203.

Rai, Prabhat. 2008. Heavy Metal Pollution in Aquatic Ecosystems and Its Phytoremediation Using Wetland Plants: An Ecosustainable Approach. International Journal of Phytoremediation. 10(2): 131-158. DOI: 10.1080/15226510801913918.

Rand, G. M. (Ed). 1995. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. Florida, USA. CRC Press.

Rand, G. M. y S. R. Petrocelli. 1985. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Washington Hemisphere Publishing Corporation. Washington D. C. 670 pp.

Rao, J.V., Srikanth, K., Arepalli, S.K., Gunda, V. 2006. Toxic effects of acephate on *Paramecium caudatum* with special emphasis on morphology, behaviour, and generation time. Pesticide Biochemistry and Physiology. 86(3): 131-137. DOI: 10.1016/j.pestbp.2006.02.005

Rehman, A., Shakoori, F.R. and Shakoori, A.R. 2008. Uptake of heavy metals by *Stylonychia mytilus* and its possible use in decontamination industrial wastewater. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24: 47-53. DOI: 10.1007/s11274-007-9436-1

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Rehman, A., Shakoori, F.R. and Shakoori, A.R. 2009. Heavy metal uptake by *Euplotes mutabilis* and its possible use in bioremediation of industrial wastewater. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 83: 130-135. DOI: 10.1007/s00128-009-9725-5

Rehman, A., Shakoori, F.R., Shakoori, A.R. 2010. Multiple heavy metal tolerant ciliates, *Oxytricha fallax* and *Paramecium caudatum*, isolated from industrial effluents and their potential use in wastewater treatment. *Pakistan Journal of Zoology*. 42(3): 301-309.

Reynoso, L. y Andrulio, A. 2009. Estado actual de la calidad del agua en la Cuenca del Arrollo Pergamino. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino. Instituto nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.

Robinson, K., Baird, D., Wrona, F. 2003. Surface metal adsorption on zooplankton carapaces: Implications for exposure and effects in consumer organisms. *Environmental Pollution*. 122: 159-67. DOI: 10.1016/S0269-7491(02)00302-0.

Roesijadi, G. and W. E. Robinson. 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation, and release. In *Aquatic toxicology, molecular, Biochemical and cellular perspectives*, Malins, D. C. and G. K. Ostrander, Eds., CRC Press, Boca Raton, FL.

Ruppert, E. and Barnes, R. 1996. *Zoología de los invertebrados*. McGraw-Hill Interamericana Editores. México – México. 759-762, 793.

Saeed, S. M. and Shaker, I. M. 2008. Assessment of heavy metals pollution in water and sediments and their effect on *Oreochromis niloticus* in the Norther Delta Lakes, Egypt. *Eight International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. 475-489 pp.

Santos-Medrano, G. E, Rico-Martínez, R. 2013. Lethal effects of five metals on the freshwater rotifers *Asplanchna brighwellii* and *Brachionus calyciflorus*. *Hidrobiologica* 23: 82-86.

Santos-Medrano, G. E. and Rico-Martínez, R. 2015. Acute and Chronic Effects of Five Metals in a Battery of Freshwater Planktonic organisms. *Fresenius Environmental Bulletin* 24(12b): 4658-4666.

Sarma, S. S. S., Azuara-García, R., Nandini, S. 2007. Combined effects of zinc and algal food on the competition between planktonic rotifers *Anuraeopsis fissa* and *Brachionus rubens* (Rotifera). *Aquatic Ecology*. 41: 631-638. DOI: 10.1007/s10452-007-9120-4

Segers, H. 2008. Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater. *Hydrobiologia*. 595: 49-59. DOI: 10.1007/s10750-007-9003-7

*Selenastrum capricornutum*. *Water Research*. 8: 179-185.

SEMARNAT. 2013. Informe de la Situación Del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. Edición 2012. México.

Shakoori, A.R., Rehman, A. and Haq, R.U. 2004. Multiple metal resistance in the ciliate protozoan, *Vorticella microstoma*, isolated from industrial effluents and its potential in bioremediation of toxic wastes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*., 72: 1046-1051. DOI: 10.1007/s00128-004-0349-5

Sharma, S. K. 2015. Heavy Metals in Water Presence, Removal and Safety. JECRC, India, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. 357 pp.

Shingles, R., Wimmers, L. E., McCarty, R.E. 2004. Copper transport across pea thylakoid membranes. *Plant Physiology*. 135: 145-151. DOI: 10.1104/pp.103.037895

Shuhaimi-Othman, M., Yakub, N., Ramle. 2014. Sensitivity of Freshwater Organisms to Nickel. *International Conference on Biological, Chemical and Environmental Sciences* 7-10. DOI: 10.15242/IICBE.C614022

Sierra, R. C. A. 2011. Calidad del agua: evaluación y diagnóstico. Bogotá, CO: Ediciones de la U. Retrieved from <http://www.ebrary.com>

Simon-Hettich, B., Wibbertmann, A., Wagner, D., Tomaska, L., Malcolm, H. 2001. Environmental Health Criteria 221 ZINC. World Health Organization. Geneva.

Snell, T. W. and Janssen C. R. 1998. Microscale Testing with rotifers. En: Microscale Testing in Aquatic Toxicology. Wells, Lee y Blaise (eds.). CRC Press. Boca Raton, Florida, E.U.A.: p. 409-42.

Snell, T. W. and Janssen, C. R. 1995. Rotifers in ecotoxicology: a review. *Hydrobiologia*. 313/314: 231-247

Snell, T. W. and Janssen, C. R., 1997. Microscale toxicity testing with rotifers. In: Microscale aquatic toxicology. Advances, techniques and practice (eds. P.G. Wells, K. Lee and C. Blaise), pp. 409-422. CRC Lewis Publishers, Florida.

Snell, T. W. and Persoone, G. 1989a. Acute toxicity bioassays using rotifers. I. A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*. *Aquatic Toxicology*. 14: 65-80. DOI: 10.1016/0166-445X(89)90055-6

Snell, T. W. and Persoone, G. 1989b. Acute toxicity bioassays using rotifers. II. A fresh water test with *Brachionus rubens*. *Aquatic Toxicology*. 14: 81-91. DOI: 10.1016/0166-445X(89)90056-8

Snell, T.W., 1998. Chemical ecology of rotifers. *Hydrobiologia*, 387/388: 267-276

Snell, T.W., Moffat, B.D., Janssen, C., Persoone, G. 1991. Acute toxicity tests using rotifers IV. Effects of cyst age, temperature, and salinity on the sensitivity of *Brachionus calyciflorus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 21(3): 308-317. DOI: 10.1016/0147-6513(91)90070-6

Somasundaram, S., Abraham, J.S., Maurya, S., Makhija, S., Gupta, R., Toteja, R. 2018. Cellular and Molecular Basis of Heavy Metal-Induced Stress in Ciliates. *Current Science*, 114(9): 1858-1865. DOI: 10.18520/cs/v114/i09/1858-1865

Soto, C.C., Gereá, M., Queimaliños, C., Guevara, S.R., Diéguez, M. C. 2018. Inorganic mercury (Hg<sup>2+</sup>) accumulation in autotrophic and mixotrophic planktonic protists: Implications for Hg trophodynamics in ultraoligotrophic Andean Patagonian lakes. *Chemosphere*, 199: 223-231. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.02.035

Sukarni, S., Hamidi, N., Yanuhar, U., Wardana, I. 2014. Potential and properties of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* as biomass fuel feedstock. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 5(4): 279-290. DOI: 10.1007/s40095-014-0138-9

Timmermans, K.R., Peeters, W., Tonkes, M. 1992. Cadmium, zinc, lead and copper in *Chironomus riparius* (Meigen) larvae (Diptera, Chironomidae): uptake and effects. *Hydrobiologia* 241: 119–134. DOI: 10.1007/BF00008264

Tiwari, M. K., Bajpai, S., Dewangan, U. K., Tamrakar, R. K. 2015. Assessment of heavy metal concentrations in surface water sources in an industrial region of central India Karbala *International Journal of Modern Science*. 1: 9-14. DOI: 10.1016/j.kijoms.2015.08.001

Torres-Guzmán, F., Avelar-González, F. J. and Rico-Martínez R. 2010. Implementing *Lecane quadridentata* acute toxicity test to assess the toxic effects of selected metals (AL, Fe and Zn). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73: 287-295.

Tulonen, T., Pihlström, M., Arvola, L., Rask, M. 2006. Concentrations of heavy metals in food web components of small, boreal lakes. *Boreal Environ Res* 11:185–194

U. S. EPA, 1992. Manual of guidelines for water reuse. U. S. Environmental Protection Agency 625/R-92/004. Center for Environmental Research Information. Cincinnati. Ohio, 247 pp.

U. S. EPA, 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA-821-R-02-012, Washington, D. C., USA.

U. S. EPA, 2004. National Recommended Water Quality Criteria. U. S. Environmental Protection Agency. Office of Water. Office of Science and Technology (4304T).

U. S. EPA, 2014. Current national recommend water quality criteria. United States Environmental Protection Agency. National Recommended Water Quality Criteria. 2015 Jan 20. <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table>. Mayo 1, 2018.

Valdivia-Villar, R. S. 1988. Checklist offreshwater Cladocera from Perú. Amazoniana, 10: 283–297.

Van den Berghe, P. V. E., Klomp, L. W. J., 2010. Post translational regulation of copper transporters. Journal Biological Inorganic Chemistry. 15: 37-46. DOI 10.1007/s00775-009-0592-7

Van Vlaardingen PLA, Traas TP, Wintersen AM, Aldenberg T. 2017. ETX 2.2. A program to calculate hazardous concentrations and fraction affected, based on normally distributed

van Wezel, P. A., Jonker, M. T. O. 1998. Use of the lethal body burden in the risk quantification of field sediments; influence of temperature and salinity. Aquatic Toxicology 42: 287-300. DOI: 10.1016/S0166-445X(97)00090-8

Viarengo, A. 1985. Biochemical Effects of Trace Metals. Marine Pollution Bulletin. 16(49): 153-158. DOI: 10.1016/0025-326X(85)90006-2

Vignatti, A. M., Cabrera, G. C., Echaniz, S. A. 2013. Distribution and biological aspects of the introduced species *Moina macrocopa* (Straus, 1820) (Crustacea, Cladocera) in the semi-arid central region of Argentina. Biota Neotropica. 13(3): 86–92. DOI: 10.1590/S1676-06032013000300011

Volesky, B., Holan, Z. R. 1995. Biosorption of heavy metals. Biotechnology Progress. 11: 235–250. DOI: 10.1021/bp00033a001

von der Ohe, P.C., Liess, M. 2004. Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds. Environmental Toxicology and Chemistry. 23(1):150–156. DOI: 10.1897/02-577

Vuori, K. 1995. Direct and Indirect Effects of Iron on River Ecosystems. *Annales Zoologici Fennici*, 32: 317-329.

Wallace, R. L. 2002. Rotifers: exquisite metazoans. *Integrative and Comparative Biology*. 42: 660-667. DOI: 10.1093/icb/42.3.660

Wanick, R. C., Paiva, T. D. S., de Carvalho, C. N. and de Silva-Neto, I. D. 2008 Acute toxicity of cadmium to freshwater ciliate *Paramecium bursaria*. *Biociências*, , 16, 104–109

Waykar B, Shinde, S. M. 2011. Assessment of the heavy metal bioaccumulation in three species of fresh water bivalves. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*. 87(3): 267–271. DOI: 10.1007/s00128- 819011-0354-4

Wheeler, J.R., Grist, E.P.M., Leung, K.M.Y., Morritt, D., Crane, M., 2002. Species sensitivity distributions: data and model choice. *Marine Pollution. Bulletin*. 45: 192–202. DOI: 10.1016/S0025-326X(01)00327-7

Woelfl, S, Ovari, M., Nimptsch, J., Neu, T. R., Mages, M. 2016. Determination of trace elements in freshwater rotifers and ciliates by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 116: 28–33. DOI: 10.1016/j.sab.2015.12.001

Wong, C. K. 1993. Effects of Chromium, Copper, Nickel, and zinc on Longevity and Reproduction of the Cladoceran *Moina macrocopa*. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*. 50: 633-639. DOI: 10.1007/bf00194655

Wright, D. A. and Welbourn, Pamela. 2002. *Environmental Toxicology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Yu, Ming-Ho. 2001. *Environmental Toxicology, Impacts of Environmental Toxicants on Living Systems*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers.

Yu, Ming-Ho. 2005. *Environmental Toxicology, Biological and Health Effects of Pollutants*. CRC Press.

Zarazúa, G., Ávila-Pérez, P., Tejeda, S., Valdivia-Barrientos, M., Zepeda-Gómez, C., Macedo-Miranda, G. 2013. Evaluación de los metales pesados Cr, Mn, Fe, Cu, Zn y Pb en sombrerillo de agua (*Hydrocotyle ranunculoides*) del curso alto del Río Lerma, México. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 29:17-24. Disponible en: <<https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/36519>>. Fecha de acceso: 23 may 2020.

