



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

Departamento de Química

Estudio de bioacumulación y efectos adversos del cromo, en dos especies de rotíferos dulceacuícolas

Tesis Profesional

Que presenta:

Ingeniera Química: Esmeralda Hernández Ruiz

Para obtener el grado de Maestría en Ciencias en el área de Toxicología

Director de Tesis:

Dr. Roberto Rico Martínez

Comité Tutorial:

Dra. Elsa Marcela Ramírez López

Dr. Javier Ventura Juárez.

Aguascalientes, Ags., Junio 2015

Autorizaciones



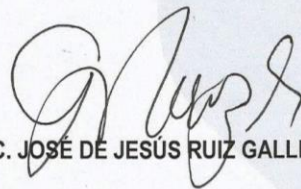
**ESMERALDA HERNANDEZ RUIZ
ALUMNA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
ÁREA TOXICOLOGIA
PRESENTE.**

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“Estudio de bioacumulación y efectos adversos del cromo, en dos especies de rotíferos dulceacuícolas”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., 09 de junio de 2015
“SE LUMEN PROFERRE”
EL DECANO



M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.
JJRG.yscd



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
PRESENTE

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **ESMERALDA HERNÁNDEZ RUIZ** con ID **159846** quien realizó la tesis titulada: **ESTUDIO DE BIOACUMULACIÓN Y EFECTOS ADVERSOS DEL CROMO, EN DOS ESPECIES DE ROTÍFEROS DULCEACUÍCOLAS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que Esmeralda pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 8 de junio de 2015.

Dr. Roberto Rico Martínez
Tutor de tesis

Dr. Javier Ventura Juárez
Asesor de tesis

Dra. Elsa Marcela Ramírez López
Asesor de tesis

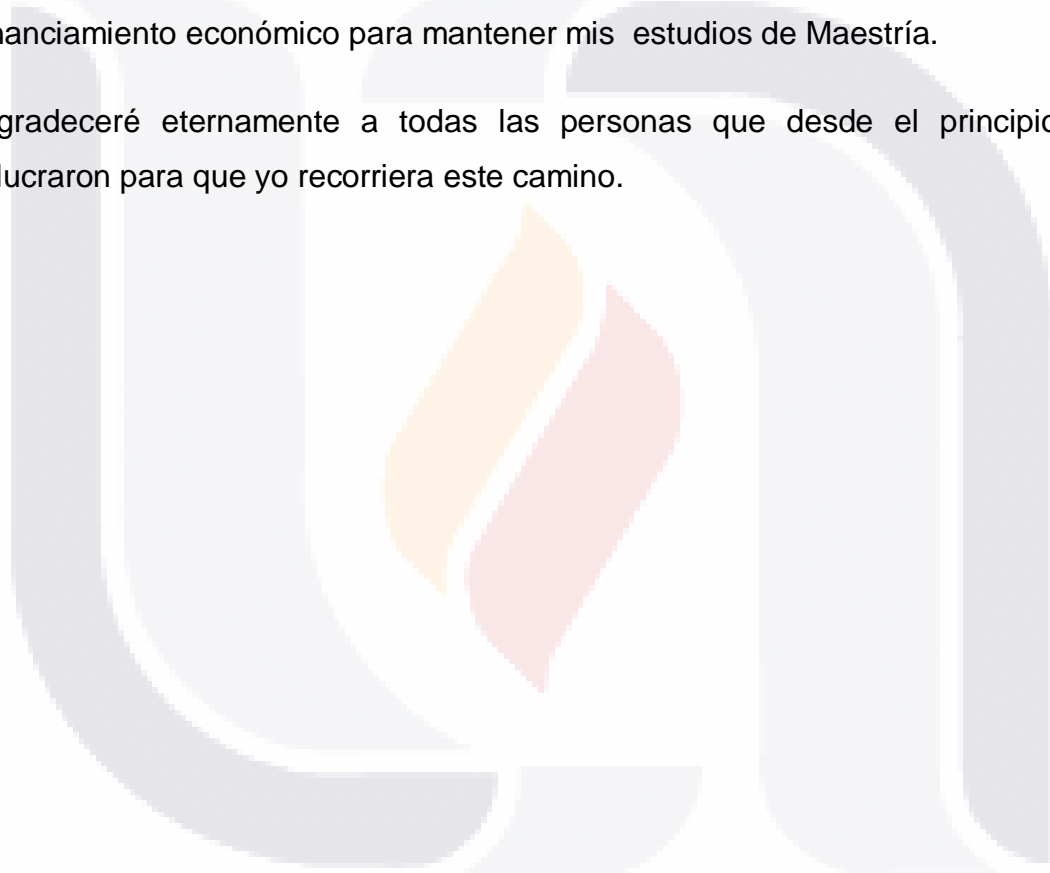
c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de QUÍMICA
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Roberto Rico Martínez por el asesoramiento, apoyo y comprensión, que siempre me brindó. A mi amigo y compañero el Dr. Jesús Alvarado Flores, por sus consejos y ayuda. A mi Comité Tutorial la Dra. Elsa Marcela Ramírez López y el Dr. Javier Ventura Juárez. A Isidoro Rubio Franchini.

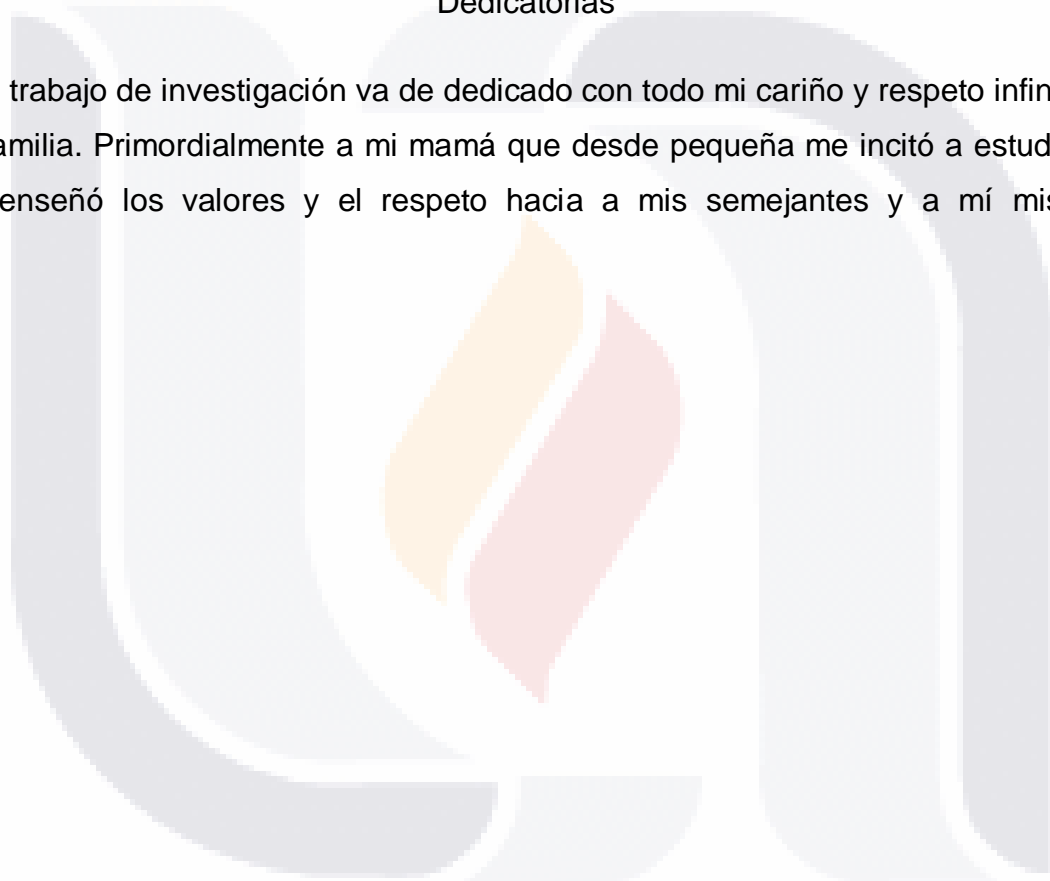
Agradezco a la Dirección y Coordinación de Posgrado de la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el financiamiento económico para mantener mis estudios de Maestría.

Y agradeceré eternamente a todas las personas que desde el principio se involucraron para que yo recorriera este camino.



Dedicatorias

Este trabajo de investigación va de dedicado con todo mi cariño y respeto infinito a mi familia. Primordialmente a mi mamá que desde pequeña me incitó a estudiar y me enseñó los valores y el respeto hacia a mis semejantes y a mí misma.



Índice

Resumen	5
Abstract	6
Introducción	7
1. Antecedentes	8
1.1 Bioacumulación de metales	8
1.2 Características del Cromo	10
1.3 Mecanismo de Toxicidad del Cromo	11
1.4 Rotíferos Dulceacuícolas	12
1.5 Pruebas de Toxicidad	13
1.6 El cromo en el ambiente acuático	15
1.7 Efectos del cromo en la biota acuática	16
1.8 Estudios de toxicidad del cromo en Aguascalientes	17
2. Hipótesis	18
3. Objetivos	18
3.1 Objetivo Particular	18
3.2 Objetivos Generales	18
4. Metodología	19
4.1 Cultivo de Rotíferos	19
4.2 Pruebas Toxicológicas	20
4.3 Determinación del Factor de bioconcentración del Cromo	21

4.4 Inmunohistoquímica a Metalotioneínas	21
4.5 Análisis de la morfología interna y externa por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y la determinación elemental del Cromo en la estructura por Microanálisis de Rayos X por Dispersión de Energía	22
5. Resultados	23
5.1 CL ₅₀ , CNOE, CMOE	23
5.2 Detección de metalotioneínas en organismos control e intoxicados	31
5.3 Detección de Cromo Trivalente y Hexavalente en las especies de rotíferos <i>Brachionus calyciflorus</i> y <i>Lecane quadridentata</i>	38
5.4 Monitoreo de Cromo en los rotíferos <i>Brachionus calyciflorus</i> y <i>Lecane quadridentata</i> , por espectrofotometría de absorción atómica	46
6. Discusiones	49
6.1 Concentraciones Letales Medias de Cromo Trivalente y Cromo Hexavalente en especies acuáticas	49
6.2 Bioacumulación del Cromo Hexavalente y Cromo Trivalente en <i>Brachionus calyciflorus</i> y <i>Lecane quadridendata</i>	50
6.3 Efecto del Cromo en la composición elemental de los rotíferos en un análisis de rayos X, por microscopia electrónica de barrido	52
6.4 Respuestas bioquímicas a metalotioneínas	53
7. Conclusiones	55
Glosario	57
Bibliografía	59
Anexos	67

Índice de Cuadros.

Cuadro 1. Límites máximos permisibles para cromo total. (Adaptado de NOM-001-ECOL-1996) 17

Cuadro 2. Rango de concentraciones para cada especie de rotíferos 20

Cuadro 3. Valores de toxicidad obtenidos del ensayo agudo con cromo III y VI, para cada tipo de especie de rotíferos 34

Índice de Figuras

Figura 1. Regresión lineal del Cromo III, *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville .
..... 25

Figura 2. Regresión lineal del Cromo VI, *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville
..... 26

Figura 3. Regresión lineal del Cromo III, *Brachionus calyciflorus* cepa San Pancho
..... 27

Figura 4. Regresión lineal del Cromo VI, *Brachionus calyciflorus* cepa San Pancho
..... 28

Figura 5. Regresión lineal del Cromo III *Lecane quadridentata* 29

Figura 6. Regresión lineal del Cromo VI, *Lecane quadridentata* 30

Figura 7. Inmuno metalo patrones de rotíferos *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridentata*. (Hernández-Ruiz con colaboración de Alvarado-Flores) 32

Figura 8. Expresión de Metalotioneínas en *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridentata*, intoxicados con Cr III y Cr VI. (Hernández-Ruiz con colaboración de Alvarado-Flores) 34

Figura 9. Patrones de detección de Metalotioneínas en *Brachionus calyciflorus* (Hernández-Ruiz con colaboración de Alvarado-Flores) 36

Figura 10. Patrones de detección de metalotioneínas en *Lecane quadridentata*. (Hernández-Ruiz con colaboración de Alvarado-Flores) 37

Figura 11. Composición elemental (Control) para *Lecane quadridentata* 39

Figura 12. Composición elemental Cr III [CL₅₀] para *Lecane quadridentata* 40

Figura 13. Composición elemental Cr VI [CL₅₀] para *Lecane quadridentata* 41

Figura 14. Composición elemental Cr III [CL₅₀] para *B.C. Gainesville* 42

Figura 15. Composición elemental Cr VI [CL₅₀] para *B.C. Gainesville* 43

Figura 16. Composición elemental Control (M1). Media ± desviación estándar, para *Lecane quadridentata* 44

Figura 17. Composición elemental de Cromo III CL₅₀, para *Lecane quadridentata* (M2). Media ± desviación estándar 45

Figura 18. Composición elemental de Cromo VI CL₅₀ (M5), para *Lecane quadridentata*. Media ± desviación estándar 45

Figura 19. Composición elemental de Cromo III, límite superior (M10), para *B.C. Gainesville*. Media ± desviación estándar 46

Figura 20. Factores de Bioconcentración con Cr III para cada especie. Media ± desviación estándar 47

Figura 21. Factores de Bioconcentración con Cr VI para cada especie. Media ± desviación estándar 48

Resumen

Se estudió la bioacumulación del metal de transición cromo (Cr) en sus estados de valencia III y VI, y sus efectos adversos, en dos especies de rotíferos dulceacuícolas: *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridendata*. Se estimó la Concentración Letal Media (CL₅₀) de la población expuesta a 24 horas, realizando una regresión con el logaritmo de la concentración de exposición y la respuesta a la exposición (mortalidad en unidades probit). Se analizó el efecto del cromo sobre la composición elemental de las dos especies de rotíferos en sus estructuras internas y externas por microanálisis de rayos X por dispersión de energía, se logró detectar el metal cromo, además de cobre, calcio, carbono y oxígeno principalmente. Los resultados obtenidos en este estudio reflejaron que el cromo hexavalente (VI) es altamente tóxico a concentraciones muy bajas: *B. calyciflorus* cepa Gainesville (CL₅₀ = 4X10⁻⁶mg/L); *B. calyciflorus* cepa San Pancho (CL₅₀ = 4X10⁻⁶mg/L); *Lecane quadridendata* (CL₅₀ = 4.7 X10⁻⁵ mg/L). Sin embargo, para el cromo trivalente fueron más tolerantes las dos especies: *B. calyciflorus* cepa Gainesville (CL₅₀ = 1.051mg/L) y *B. calyciflorus* cepa San Pancho (CL₅₀ = 0.64mg/L) y *Lecane quadridendata* (CL₅₀ = 1.279mg/L). Tomando como referencia el valor de la CL₅₀, también se monitoreo por espectrofotometría de absorción atómica en la modalidad horno de grafito y se obtuvo el factor de bioconcentración: Para *Lecane quadridendata* FBC_{Cr III} = 569.899217; FBC_{Cr VI} = 386485.855; *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville FBC_{Cr III} = 633.410357; FBC_{Cr VI} = 2149587.91; *Brachionus calyciflorus* cepa San Pancho FBC_{Cr III} = 657.680861; FBC_{Cr VI} = 4817765.57; comprobándose la bioconcentración del metal en su forma más tóxica. Las pruebas de detección de metalotioneínas a las dos especies de rotíferos corroboran que hay expresión de metalotioneínas como respuesta a la exposición al cromo trivalente y al cromo hexavalente. Observándose mayor expresión con Cr III en *Brachionus calyciflorus* que en *Lecane quadridendata*. Por tanto, la exposición a concentraciones excesivas del Cromo III y VI, son tóxicas para los rotíferos, y debido a la interacción en el ambiente con otros metales, el Cromo III por su estado de valencia puede oxidarse biotransformándose para hacerse más tóxico.

Abstract

Bioaccumulation of the transition metal chromium (Cr) in their valence states III and VI, and its adverse effects were studied in two species of freshwater rotifers: *Brachionus calyciflorus* and *Lecane quadridendata*. Median Lethal Concentration (LC₅₀) of both species exposed to 24 hours, performing a regression with the logarithm of exposure concentration and mortality (probit units) was estimated. The effect of chromium on the elemental composition of the two species of rotifers in their internal and external structures by X-ray microanalysis by energy dispersion was analyzed. It was possible to detect the metal chromium together with: copper, calcium, carbon and oxygen. The results obtained in this study showed that hexavalent chromium (VI) is highly toxic at very low concentrations: *B. calyciflorus* strain Gainesville (LC₅₀ = 4X10⁻⁶ mg / L); San Pancho *B. calyciflorus* strain (LC₅₀ = 4X10⁻⁶ mg / L); *Lecane quadridendata* (LC₅₀ = 4.7 X10⁻⁵ mg / L). However, for trivalent chromium the effect was moderate in the two species: *B. calyciflorus* strain Gainesville (LC₅₀ = 1.051mg / L) and San Pancho *B. calyciflorus* strain (LC₅₀ = 0.64mg / L) and *Lecane quadridendata* (LC₅₀ = 1.279mg / L). Taking as reference the LC₅₀ value, and using atomic absorption in graphite furnace mode, the bioconcentration factor was obtained and bioconcentration: to *Lecane quadridendata* FBC_{Cr III} = 569.899217; FBC_{Cr VI} = 386485.855; *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville FBC_{Cr III} = 633.410357; FBC_{Cr VI} = 2149587.91; *Brachionus calyciflorus* cepa San Pancho FBC_{Cr III} = 657.680861; FBC_{Cr VI} = 4817765.57; checking bioconcentrate metal in its most toxic form. Screening of metallothioneins to both corroborate rotifer species that no expression of metallothioneins in response to exposure to trivalent chromium and hexavalent chromium. Increased expression observed with Cr III in *Brachionus calyciflorus* in *Lecane quadridentata*.

Thus, the properties of chromium III and VI, are toxic to rotifers, and due to the interaction in the environment with other metals, Chromium III by its valence state can be oxidized to more toxic species via biotransformation.

Introducción.

El alto grado de contaminación acuática es ocasionado por metales pesados, compuestos volátiles, plaguicidas o herbicidas agrícolas y otros compuestos que no se degradan fácilmente. La contaminación en los sistemas acuáticos se vuelve cada vez más compleja, por el gran desarrollo industrial y las descargas de sus desechos tóxicos. Entre los metales que el hombre utiliza actualmente en diversos procesos, se encuentra el cromo, el cual puede aumentar sus concentraciones bajas en la naturaleza, significativamente debido a actividades antropogénicas, mismas que llegan a los sistemas acuáticos debido a procesos manufactureros, aguas de desecho domésticas y no domésticas, minería, fundidoras, plantas eléctricas, galvanoplastia y a la precipitación atmosférica.

Los efectos causados por concentraciones subletales de cromo al medio acuático, producen cambios biológicos y fisiológicos, en las poblaciones en diverso grado, dependiendo de su sensibilidad lo que trasciende en el funcionamiento de toda la comunidad provocando un desequilibrio a nivel ecosistema en los cuerpos de agua, lo cual no solo afecta al medio físico, sino también repercute en la economía (Flores - Tena, 2000).

El Cr se introduce a los organismos a través de las vías digestiva, cutánea y respiratoria, y puede entrar en diferentes estados de oxidación; con valencia 6+ como trióxido de cromo, cromato o dicromato; con valencia 3+ como óxido crómico e ión crómico; con valencia 2+ como ión cromoro; e incluso con valencia 0 como cromo metálico. De estos, el Cr⁶⁺ es fuertemente oxidante y corrosivo por lo que es más tóxico que las formas restantes (Albert, 1997).

Para evaluar el nivel de efecto de tales contaminantes, la ecotoxicología hace uso de la sensibilidad de ciertas especies y de protocolos estandarizados de pruebas de toxicidad. Las especies acuáticas más utilizadas son algas, protozoos, invertebrados (rotíferos, crustáceos) y vertebrados (peces) (Kefford et al., 2003).

1. Antecedentes.

1.1 Bioacumulación de metales.

En toxicología, bioacumulación es el proceso de acumulación de sustancias químicas en organismos vivos de forma que estos alcanzan concentraciones más elevadas que las concentraciones en el medio ambiente ó en los alimentos (Landis & Yu, 2003). Rubio (2009) define bioacumulación como la acumulación neta en un organismo de cualquier sustancia tóxica presente en el medio donde habita dicho organismo.

Las descargas naturales y antropogénicas de los metales influyen en la biodisponibilidad en los sistemas acuáticos. Esta fracción biodisponible no puede ser detectada mediante la medición de concentraciones de metales en la fase soluble, sino que sólo puede apreciarse mediante la determinación de la cantidad del metal incorporado en los organismos. Otra condición inevitable en la evaluación del conocimiento de acumulación, dependiendo de la especie biológica y el elemento químico considerado, es el régimen de exposición aplicada, los mecanismos de homeostasis de cationes, así como las influencias del ciclo vital en la acumulación de metales y el desarrollo de un diseño experimental apropiado en diferentes escalas espaciales y temporales (Alvarado – Flores, 2010).

La bioacumulación se puede dar en las cadenas alimenticias, por contaminantes a partir de sedimentos, partículas suspendidas y esto puede ocurrir en el agua. La acumulación en los organismos depende de varios factores que pueden ser físicos, químicos y biológicos, no solo de qué tan biodisponible sea el contaminante además, de las características que posea el organismo para acumular o excretar los contaminantes (Bryan, 1979).

En la biota acuática la bioacumulación se expresa mediante las proporciones de las concentraciones químicas en el tejido del organismo, en relación con la concentración de exposición de la sustancia química, y a esto se le conoce como Factor de Bioconcentración (FBC), los cuales pueden ser muy variables entre los

organismos y, en general inversamente proporcional a la concentración de exposición. Los factores de bioacumulación son frecuentemente mayores que los FBC del mismo metal y de las mismas especies, debido a niveles inferiores de exposición en el campo y la inclusión de la ruta de exposición alimentaria (De Forest, et al., 2007).

El factor de bioconcentración (FBC): es la relación que existe entre la concentración de tóxico en el organismo y la concentración del tóxico en el organismo respecto a su hábitat. Las concentraciones del tóxico en el organismo generalmente son determinadas en estudios de laboratorio.

El Factor de Bioacumulación (FBA): es la relación que hay entre la concentración del tóxico en el organismo respecto a la concentración en el lugar donde habita, sin embargo, es diferente al FBC porque la concentración del tóxico en el organismo acuático, resulta de todas las rutas posibles de exposición (dieta, respiración etc.).

El factor de transferencia trófica (FTT): es la relación que hay entre la concentración del tóxico en el tejido de un organismo y la concentración de tóxico en su dieta. Es decir sólo se intoxica por medio de la dieta y no en su hábitat, para esto último el FTT puede incluir el término Biomagnificación.

Por lo tanto la concentración de metales en los tejidos y su transferencia en las cadenas tróficas, nos guía por las rutas de la movilidad de los metales en los organismos (Alvarado-Flores, 2010).

Hay varios factores que determinan la bioacumulación de los metales como; índices de biotransformación (metilación y desmetilación), por efecto de las bacterias metiladoras (bacterias reductoras de sulfato). Factores bióticos como hábitat régimen alimentario, naturaleza y cantidad de alimento disponible, y por las variaciones del volumen pluvial según las estaciones y fluctuaciones climatológicas y factores abióticos como: características físico-químicas del agua y sedimentos (Rubio, 2009).

1.2 Características del Cromo.

El cromo es un metal de transición localizado en el grupo VI-B de la Tabla Periódica. Aunque puede existir en varios estados de oxidación, las formas más comunes y estables en el ambiente son el Cr trivalente Cr (III) y el Cr hexavalente Cr (VI), las cuales poseen propiedades químicas distintas. El Cr (VI), considerado la forma más tóxica del cromo, se encuentra usualmente asociado al oxígeno en forma de cromatos (CrO_4^{2-}) y dicromatos ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), que debido a su gran solubilidad son altamente móviles en el suelo y en ambientes acuáticos. Por otra parte, el Cr (III) se encuentra en forma de óxidos, hidróxidos o sulfatos poco solubles, por lo cual es mucho menos móvil, y existe unido a materia orgánica en el suelo y en ambientes acuáticos (Palmer y Wittbrodt, 1991).

El Cr (VI) es un fuerte agente oxidante y en presencia de materia orgánica es reducido a Cr (III); esta transformación es más rápida en ambientes ácidos. Sin embargo, niveles elevados de Cr (VI) pueden sobrepasar la capacidad reductora del ambiente y puede así persistir como un contaminante. Actualmente, se ha establecido que diversos compuestos de cromo, en forma de óxidos, cromatos y dicromatos, son contaminantes ambientales presentes en agua, suelos y efluentes de industrias, debido a que dicho metal es ampliamente utilizado en distintas actividades manufactureras, tales como cromado electrolítico, fabricación de explosivos, curtido de pieles, aleación de metales, fabricación de colorantes y pigmentos, etc. (Calder, 1988).

1.3 Mecanismo de Toxicidad del Cromo.

Los efectos biológicos del Cr dependen de su estado de oxidación. El Cr (VI) es considerado la forma más tóxica del metal, debido a que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y puede ser transportado activamente al interior de las células por medio del transportador de sulfato (Borst-Pauwels, 1981).

El Cr (VI) es altamente tóxico para todas las formas de vida, siendo mutagénico y carcinogénico en animales y mutagénico en bacterias (Losi *et al.*, 1994). Se ha propuesto que la toxicidad del Cr (VI) se debe a que dentro de las células se generan intermediarios reducidos de cromo que en presencia de H_2O_2 funcionan como catalizadores de una reacción tipo Fenton, generando Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), con el consecuente daño oxidativo, produciendo peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y ácidos nucleicos (Ercal *et al.*, 2001; Liu y Shi, 2001). Las ERO incluyen el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno molecular (dioxígeno) que tiene una configuración única y es considerado por sí mismo un radical libre. La adición de un electrón al dioxígeno forma el radical superóxido (Miller *et al.*, 1990). Este radical es considerado la principal ERO porque reacciona con un mayor número de moléculas para formar otras ERO secundarias en donde participa directa o indirectamente en reacciones catalizadas por metales de transición (Valko *et al.*, 2005).

Sumner *et al.* (2005) establecieron que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la oxidación de proteínas es el principal mecanismo de toxicidad de Cr (VI), siendo las proteínas glicolíticas y las de choque térmico las principalmente oxidadas, además de que la oxidación es isoforma específica. Hasta la fecha se desconoce si dicho mecanismo explica la toxicidad del Cr (VI) en otros sistemas biológicos. Por otra parte, los compuestos de Cr (III) son relativamente inocuos debido a que son insolubles y no pueden atravesar las membranas biológicas, aunque en altas concentraciones pueden presentar los mismos efectos tóxicos que los de Cr (VI) (Wong y Trevors, 1988; Katz y Salem, 1993). No obstante, el Cr (III) funciona como un oligoelemento esencial para los seres humanos, ya que ayuda a

promover la acción de la insulina en los tejidos, para aprovechar azúcares, grasas y proteínas (Anderson, 1989).

1.4 Rotíferos Dulceacuícolas.

Los rotíferos son organismos microscópicos (su tamaño varía entre unos pocos micrómetros hasta 2 mm), en algunos casos pueden ser el grupo más importante en términos de biomasa y aporte de energía de la comunidad zooplanctónica. Son principalmente consumidores primarios y de ambientes dulceacuícolas (Alvarado-Flores, 2010).

Se caracterizan por una estructura ciliar anterior llamada corona (que sirve para movimiento y alimentación), y una mandíbula formada de quitina llamada trofos, asociada a un conjunto de músculos, que forman el mástax (Ricci y Balsamo, 2000).

Estos microorganismos colonizan ambientes con distintos grados de salinidad, pH, y temperatura, tolerando la mayoría de ellos concentraciones bajas de oxígeno. Se reproducen por partenogénesis cíclica y, bajo condiciones adversas del ambiente como escasez o baja calidad de alimento, se presenta la reproducción sexual con la presencia temporal de machos y la formación de quistes o huevos de resistencia (Nogrady y Snell., 1993).

El uso de rotíferos en pruebas de toxicidad es muy común debido: *a)* que son consumidores primarios en el ecosistema, *b)* a su práctico tamaño (0.5 mm a 2.0 mm), *c)* a su alta sensibilidad a diferentes contaminantes, a su facilidad y bajos costos de cultivo y a su corto tiempo de vida (APHA, 1998).

1.5 Pruebas de Toxicidad.

Las pruebas de toxicidad se usan para identificar los agentes químicos que pueden tener efectos adversos sobre los organismos; aportando una base de datos para posteriormente evaluar riesgos asociados a los escenarios donde el agente químico, el organismo, y las condiciones de exposición estén definidos. El objetivo de una prueba de toxicidad es medir el grado de respuesta producido por un estímulo en un nivel específico (Rand y Petrocelli, 1985). En las pruebas de toxicidad se incluyen controles que permiten analizar los datos. De hecho, existen tres tipos básicos de control:

- a) Control negativo. Comprende un grupo de organismos con la misma agua de dilución (sin material de prueba o solvente) manteniendo las mismas condiciones y procedimientos. Esto determina los efectos relacionados con la salud de los organismos y calidad del agua de dilución.
- b) Control solvente. Involucra el uso de un solvente orgánico o vehículo que se utiliza para preparar las soluciones madre de los materiales de prueba. Este comprende el máximo volumen del solvente que se utilizó para preparar las concentraciones del material de prueba. Considera los efectos del solvente en los organismos de prueba, los cuales deben ser relativamente bajos al compararlos con el material de prueba. Los solventes típicos son: acetona, dimetil formamida (DMF), dimetil sulfóxido (DMSO), y glicol trietileno (TEG).
- c) Control positivo (referencia). Se utiliza un material conocido que provoca un efecto definido en los organismos de prueba. El control de referencia ideal debe de ser tóxico a bajas concentraciones, rápidamente letal, estable, no selectivo, y detectable por técnicas analíticas conocidas. Este control positivo, se utiliza para determinar la salud y susceptibilidad de los organismos, así como para evaluar la reproducibilidad de los datos de prueba con el tiempo (Rand y Petrocelli, 1985).

Organismos de prueba (Rand y Petrocelli, 1985).

Criterios para la selección:

- a) Utilizar las especies posibles, debido al amplio rango de susceptibilidad intraespecífica.
- b) Considerar especies abundantes y fácilmente disponibles.
- c) Utilizar especies nativas o representativas del ecosistema que recibirá el impacto.
- d) Las especies deben tener importancia económica y ecológica.
- e) Disposición de las especies para mantener una rutina en el laboratorio.
- f) Tener datos de información de su biología básica para poder interpretar los datos de prueba más fácilmente.

Métodos de prueba de toxicidad acuática.

Se clasifican de acuerdo al tiempo de exposición, situación de prueba, criterio de efectos a evaluar, y organismos a experimentar. Por tanto, a partir de los datos obtenidos, el investigador puede determinar valores como la Concentración donde No se Observa Efecto (CNOE), siendo esta la máxima concentración del material de prueba que genera un efecto no significativo estadísticamente al compararlo con el control en una prueba específica. También puede determinar la Concentración Mínima donde se Observa un Efecto (CMOE), la cual se define como la concentración más baja que tiene un efecto letal estadísticamente significativo en los organismos, con respecto al control. La evaluación de algunos efectos sobre parámetros biológicos seleccionados, puede ser por su importancia para la supervivencia, crecimiento, comportamiento y perpetuación de la especie. Tales parámetros pueden variar dependiendo del tipo de prueba de toxicidad y especies utilizadas durante la prueba de toxicidad, del mismo modo la herramienta estadística también cambia con dichas pruebas (Rand y Petrocelli, 1995).

Prueba Aguda o letal.

La prueba de *toxicidad aguda o letal* establece la relación concentración–respuesta que describe la tasa de mortalidad después de 24, 48 o 96 horas de exposición con el contaminante en comparación con un tratamiento control (concentración de exposición = 0), determinando el valor de CL₅₀ (Concentración letal para el 50% de los organismos expuestos) (Pérez-Legaspi, 2009).

1.6 El cromo en el ambiente acuático.

El cromo en el agua tiene su origen por los escurrimientos superficiales, por la deposición atmosférica o por las aguas de desecho. Este metal puede ser transportado como material suspendido y depositado finalmente en estuarios y bahías, pero es más frecuente que sea removido por la sedimentación. En aguas naturales se precipita comúnmente como hidróxido de cromo, relativamente insoluble, formado por la reacción entre el cromo trivalente (Cr⁺³) y el ión hidróxido (OH⁻¹). En aguas donde las condiciones favorecen la formación de cromo hexavalente (pH>5), el cromo permanece en forma soluble (Flores-Tena, 2000).

La concentración de cromo en aguas naturales no contaminadas generalmente es menor de 10mg/L (Irwin, 1998), mientras que la concentración en los sedimentos es más variable. Wiederholm & Dave (1989) señalan un valor promedio de 47mg/kg para lagos suecos no contaminados, Schumacher *et al.* (1995) reportan entre 8 y 21mg/kg en los sedimentos del Río Ebro en España. Pawlisz *et al.* (1997) señalan como valor promedio para los lagos canadienses un valor de 25 mg/Kg. En ecosistemas contaminados los valores se incrementan notablemente, en especial en el agua del fondo y en los sedimentos, valores de 421mg/kg y de 3539 mg/Kg de cromo se han encontrado, en los sedimentos de la presa Silva en Guanajuato, México y en el Lago Stora Aspen de Suecia, respectivamente (SEMARNAP, 1995; Wiederholm & Dave, 1989).

1.7 Efectos del cromo en la biota acuática.

El cromo es un elemento ampliamente utilizado en la industria (Stoecker, 2004), y al que se le ha prestado especial atención para establecer la toxicidad relativa en organismos acuáticos en ambas formas redox trivalente y hexavalente, es decir, en los estados de oxidación predominantes en aguas superficiales. La mayor parte de la literatura publicada concluye que el cromo hexavalente es más tóxico y tiene mayor biodisponibilidad que el cromo trivalente (Pawlisz *et al.*, 1997; Stoecker, 2004; Munn *et al.*, 2005; Shanker *et al.*, 2005).

A pesar de que el número de estudios en toxicología acuática crece cada día, no existen suficientes investigaciones sobre los efectos del cromo en la biota acuática, ni siquiera se pueden precisar los límites del intervalo de concentraciones que producen efectos nocivos, ya que algunas especies son muy sensitivas y otras son resistentes. De manera general y apoyados en la literatura científica especializada, se puede señalar que concentraciones mayores de 5mg/L de cromo producen efectos letales en muchas especies y que a concentraciones entre 0.01 y 2mg/L se observan diversos efectos subletales entre los que se pueden señalar: a) alteración en la morfología de ciertas algas, b) disminución en el crecimiento y en la reproducción de algunos invertebrados, como el cladóceros *Daphnia* y el anfípodo *Hyaella azteca*, c) disminución en la reproducción en el oligoqueto *Tubifex tubifex*, d) retraso en la emergencia en la larva del díptero *Chironomus*, y e) daño en el sistema neuroendócrino del camarón *Penaeus monodon*. El grupo biológico más estudiado, en relación al cromo, ha sido el de los peces; en la mayoría de las especies se ha reportado que el cromo en concentraciones subletales causa: a) disminución en el crecimiento, b) alteración en el metabolismo de los carbohidratos y trastornos en la reproducción, c) en algunas especies se ha observado también disminución de las respuestas inmunes y en las bentónicas se ha registrado una baja en el contenido de glóbulos rojos. Tanto en peces como en anfibios se han observado efectos teratogénicos cuando los huevecillos se desarrollan en un medio contaminado por cromo en concentraciones entre 50 y 1500 mg/L (Flores-Tena, 2010).

1.8 Estudios de Toxicidad del Cromo en Aguascalientes.

En los últimos años se han realizado estudios sobre los metales pesados en Aguascalientes. En el caso particular de la Presa El Niágara, se han encontrado en los sedimentos concentraciones de cromo, el valor más alto de sedimentos de cromo se obtuvo en la estación el centro de la presa con 10.62 mg/Kg en 18 de mayo de 1999 (Ojeda-Gómez, 2006).

Sedimentos de cromo entre 5 y 85 mg/Kg y un valor promedio de 39.8 mg/Kg (Flores-Tena, 2010). Un valor por arriba de la concentración de seguridad señalada por Smith *et al.* (1996) de 37.3 mg/Kg y de la referida por Persaud *et al.* (1992) para efectos mínimos de 26.0 mg/kg.

Por otra parte en lo que respecta aguas residuales, la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, considera al cromo como uno de los metales que en concentraciones por encima de determinados límites, puede producir efectos en la salud humana, flora y fauna. Los límites máximos permisibles para el cromo se resaltan en el siguiente cuadro. (NOM-001-ECOL-1996).

Cuadro 1. Límites máximos permisibles para cromo total

Límites máximos permisibles para cromo total (mg/L)															
Ríos						Aguas Costeras						Suelos			
Uso en riego agrícola (A)		Uso público urbano (B)		Protección de vida acuática (C)		Explotación pesquera, navegación y otros usos (A)		Recreación (B)		Estuarios (B)		Uso en riego agrícola (A)		Humedales Naturales	
P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D	P.M	P.D
1.0	1.5	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	1.0	1.5	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0

Ref. (NOM-001-ECOL-1996)

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

(A), (B) y (C): Tipo de Cuerpo Receptor según la Ley Federal de Derechos.

En particular, los estudios sobre los efectos tóxicos del cromo en organismos acuáticos comprenden sólo los realizados con invertebrados planctónicos y bentónicos. Entre los primeros se encuentran los realizados por Rico-Martínez *et al.* (2000) quienes determinaron en tres especies de cladóceros los siguientes valores de CL₅₀: 3.35 mg/L para *Daphnia magna*, 1.76 mg/L para *D. pulex*, 3.37 mg/L para *Simocephalus vetulus*, en el que reporta tanto valores de CL₅₀ como valores de concentraciones que producen efectos mínimos y concentraciones donde no se observan efectos. Pérez-Legaspi (2000) en tres especies de rotíferos del género *Lecane*, obtuvo los valores de las CL₅₀: 3.26 mg/L para *L. luna*; 4.41 para *L. hamata* y 4.50 para *L. quadridentata*.

2. Hipótesis.

El cromo III y VI, se bioacumula en los rotíferos dulceacuícolas y les causa efectos adversos.

3. Objetivos.

3.1 Objetivo General.

Determinar la bioacumulación de cromo trivalente (III) y de cromo hexavalente (VI) y sus efectos adversos, en dos especies de rotíferos dulceacuícolas (*Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridentata*).

3.2 Objetivos Particulares.

- Examinar el efecto del cromo III y cromo VI, en las especies de rotíferos, para obtener valores de CL₅₀, CNOE y CMOE.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Obtener el factor de bioconcentración del cromo, en las especies de rotíferos, *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridentata*.
 - Analizar por microscopía electrónica de barrido (MEB) la ultraestructura en los rotíferos *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridentata*.
 - Analizar la bioacumulación del cromo y los efectos adversos, mediante el análisis de la composición de cromo por difracción de rayos X.
 - Detectar la expresión de metalotioneínas por Inmunohistoquímica, en *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridentata*.

4. Metodología.

4.1 Cultivo de Rotíferos.

Los rotíferos *Brachionus calyciflorus* (cepa Gainesville, cepa San Pancho colectada en San Francisco de los Romo, Aguascalientes, coordenadas N 220.6764°, 102.27467° W) y *Lecane quadridentata* se cultivaron acorde al protocolo de Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (1998). Empleando una cámara bioclimática con un foto-período de 16:8 h (luz/oscuridad), a una temperatura de 25°C ± 2°C. Los rotíferos se colocaron en cajas Petri con medio EPA (U.S Environmental Protection Agency, 1985) y se alimentaron con el alga verde *Nannochloris oculata* (Cepa LB2194 de la colección de la Universidad de Texas) cultivada en medio Bold's (Nichols, 1973).

4.2 Pruebas Toxicológicas.

Se consideraron 6 concentraciones, incluyendo el control negativo, con 6 réplicas. Se colocaron 10 neonatos (menos de 24 horas de nacidos) de los rotíferos de las dos especies (*Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville y *Brachionus calyciflorus* cepa San Pancho y *Lecane quadridentata*) respectivamente en cada poza, para el control y las diferentes concentraciones en mg/L (ver Cuadro 2), en un volumen total por poza de 1000µL. Se llevaron a la cámara bioclimática (Revco Scientific, Inc) sin alimento y sin renovación del medio EPA por un tiempo de 24 horas, con una foto-período de 16:8 h (luz/oscuridad), a una temperatura de 25°C ± 2°C. Finalizado el tiempo de exposición al tóxico, se observó y registró el número de individuos muertos en cada concentración así como del control, verificándose en éste último una mortalidad menor o igual al 10% que permitiera considerar la prueba como válida.

Cuadro 2. Rango de concentraciones para cada especie de rotíferos.

Especie	Rango de concentraciones (mg/L)	
	Cr III	Cr VI
<i>Brachionus calyciflorus</i> cepa Gainesville	0- 2.0	1- 0.00001
<i>Brachionus calyciflorus</i> cepa San Pancho	0- 2.0	0- 0.00001
<i>Lecane quadridentata</i>	0- 2.5	0- 0.0001

4.3 Determinación del Factor de bioconcentración del Cromo.

Las **pruebas de bioacumulación** involucran la realización de pruebas de bioconcentración; prediciendo el factor de bioconcentración (FBC) debido a la liposolubilidad de las sustancias químicas.

Se determinó el cromo trivalente y el cromo hexavalente en agua y rotíferos por espectrofotometría de absorción atómica usando un aparato de la marca Perkin-Elmer 3110 (Norwalk, CT) en la modalidad horno de grafito HGA 600 con un auto-muestreador AS-60, acorde al protocolo de Mejía (1997), con un límite de detección para la técnica de 1.8 µg/L. Se calculó el factor de bioconcentración (FCB) por medio de la fórmula de Paquin *et al.* (2003).

Se emplearon 100 rotíferos del cultivo de *Brachionus calyciflorus* de cada una de las cepas Gainesville y San pancho y 200 rotíferos de *Lecane quadridentata* se expusieron con el valor respectivo de las dosis de CL₅₀ para cada especie (ver Cuadro 3) de cromo trivalente y cromo hexavalente, durante 24 horas sin alimento en condiciones de laboratorio, en un volumen final de 2 mL. Se consideraron controles de EPA y EPA con cromo sin rotíferos. La determinación del cromo se realizó al inicio del experimento y transcurridas las 24 horas, con 3 réplicas.

4.4 Inmunohistoquímica a Metalotioneinas.

Se colocaron 100 rotíferos de diferentes edades, de cada una de las especies (*Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridentata*) intoxicados y expuestos 24 horas a las Concentraciones Letales Medias, en un tubo Eppendorf para llevar a un volumen final de 1 mL, después se adicionaron 100 µL de paraformaldehído al 4% para fijar a los rotíferos. Se llevó a cabo la técnica Inmunohistoquímica DAB, en tejidos de rotíferos, siguiendo el protocolo de Ventura-Juárez (2014), con modificaciones (Alvarado-Flores y Hernández-Ruiz). Se procedió con la misma metodología a excepción de la desparafinización en cortes, ya que se realizó en organismos completos. Al final se montaron los microorganismos en un

portaobjetos, en glicerol puro y se sellaron con esmalte. Se tomaron fotografías en microscopio óptico compuesto, utilizando los objetivos 20X y 100X.

4.5 Análisis de la morfología interna y externa por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y la determinación elemental del Cromo en la estructura por Microanálisis de Rayos X por Dispersión de Energía.

Se realizó el análisis en las dos especies de rotíferos *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridentata*, cultivados en laboratorio acorde al protocolo de Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (1998). Se colectaron de los cultivos de rotíferos, 100 organismos de diferentes edades de las dos especies respectivamente, se colocaron en un tubo Eppendorf en un volumen final de 1 mL y se adicionaron 100 μ L de formol al 4%. Por otro lado los rotíferos intoxicados fueron expuestos 24 horas a las concentraciones CL_{50} , una concentración superior y una inferior (Ver Anexo B), del cromo en su estado de valencia trivalente y hexavalente, sin alimento antes de su procesamiento para la microscopía electrónica de barrido. Las muestras se deshidrataron con alcohol (60 a 100%), se eliminó la humedad por medio de una secadora de punto crítico (Tousimis) con CO_2 líquido. Para la determinación de Cromo en estructuras internas y externas por Rayos X en el microscopio electrónico de barrido, varios rotíferos se mantuvieron intactos, de modo que pudieran ser identificados mediante microscopía electrónica de barrido. Otros fueron disectados con agujas de alambre de tungsteno, para permitir realizar el análisis ultraestructural. Las muestras fueron luego recubiertas con oro utilizando una cámara DESK II, y se fotografiaron con JEOL LV 5000 MEB. El análisis es representado con histogramas e imágenes de distribución de elementos químicos presentes en las muestras, el espectro se obtiene mediante un software (INCA) que recoge durante un tiempo determinado los fotones emitidos por la muestras, clasificándolos según su energía. El espectro se presenta como un histograma en donde el eje de las "x" tiene unidades de energía (kiloelectrovolts) y el eje de las "y" el número de cuentas o intensidad. El análisis es cualitativo y cuantitativo, con un rango de penetración de los rayos X de 1000

nm. En las muestras se eligieron sitios de interés como: cutícula, corona, pie, para ver si toda la muestra contiene los mismos elementos o hay variación de estos en un cm^2 .

5. Resultados.

5.1 Concentración letal media (CL_{50}).

Se estimó la Concentración Letal Media (CL_{50}), parámetros de la concentración donde no se observa efecto (CNOE) y concentración donde se observa un efecto mínimo (CMOE), de la población expuesta a 24 horas, realizando una regresión con el logaritmo de la concentración y la respuesta a la exposición (Figuras 1-6).

Los resultados obtenidos en este ensayo reflejaron que el cromo hexavalente (VI) es altamente tóxico a concentraciones muy bajas a diferencia del cromo trivalente (III), siendo más susceptible *Brachionus calyciflorus* que *Lecane quadridendata*. (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores de toxicidad obtenidos del ensayo agudo con cromo III y VI, para cada tipo de especie de rotíferos.

Especie	Tipo de Cromo	CL ₅₀ (mg/L)	CNOE (mg/L)	CMOE (mg/L)	R ²	LC 95%
<i>Brachionus calyciflorus</i> cepa Gainesville	Trivalente	1.051	<0.1	0.1	0.70	0.440-1.662
	Hexavalente	4 x 10 ⁻⁶	<1x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁶	0.77	4x10 ⁻⁶ - 5x10 ⁻⁵
<i>Brachionus calyciflorus</i> cepa San Pancho	Trivalente	0.64	<0.1	0.1	0.78	0.3-0.98
	Hexavalente	4 x 10 ⁻⁶	<1x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁶	0.68	3x10 ⁻⁶ - 5x10 ⁻⁶
<i>Lecane quadridentata</i>	Trivalente	1.279	<0.1	0.1	0.73	0.835-1.723
	Hexavalente	4.7x10 ⁻⁵	<1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁵	0.79	4x10 ⁻⁵ - 5.5x10 ⁻⁵

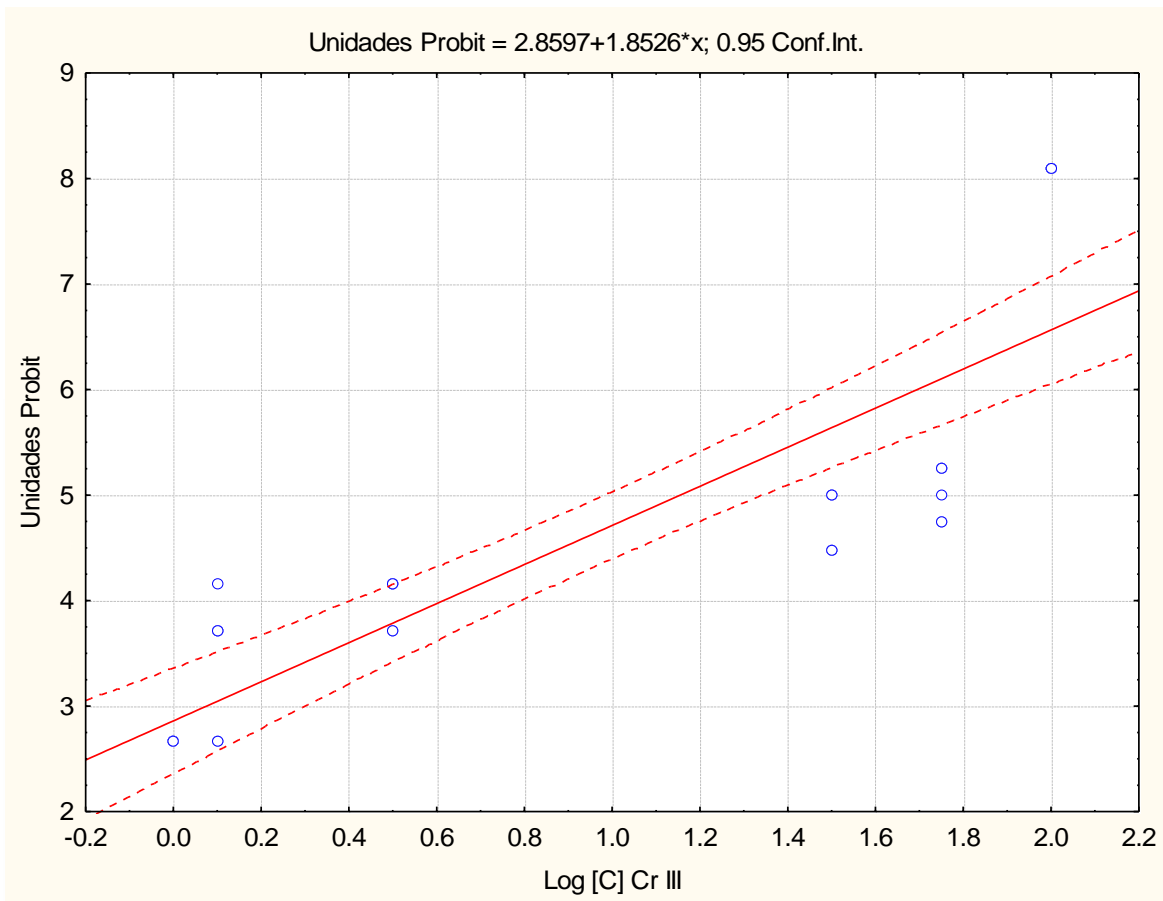


Figura 1. Regresión lineal del Cromo III, *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville.

En el eje de las ordenadas, las unidades probit, representan la mortalidad de los organismos y en el eje de las abscisas el logaritmo de la concentración es representado en mg/ L.

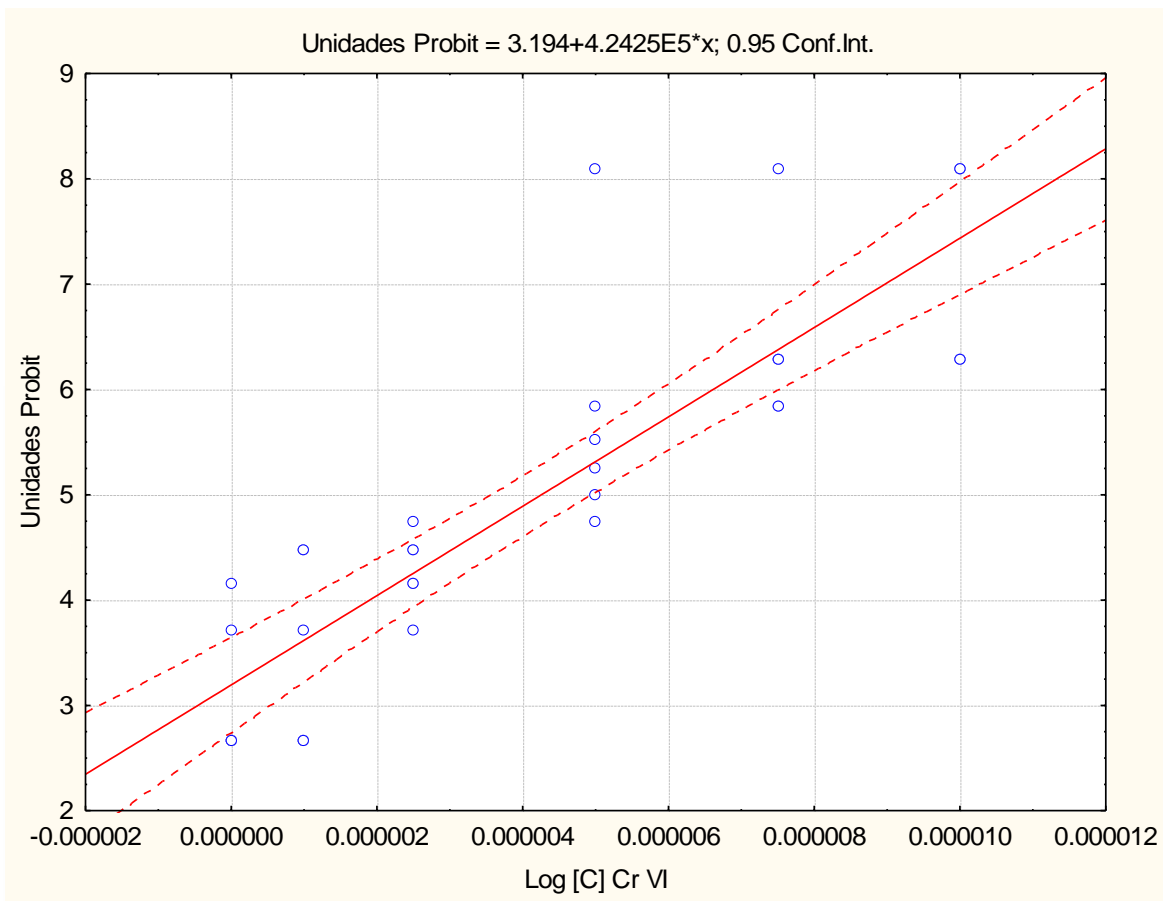


Figura 2. Regresión lineal del Cromo VI, *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville.

En el eje de las ordenadas, las unidades probit, representan la mortalidad de los organismos y en el eje de las abscisas el logaritmo de la concentración es representado en mg/ L.

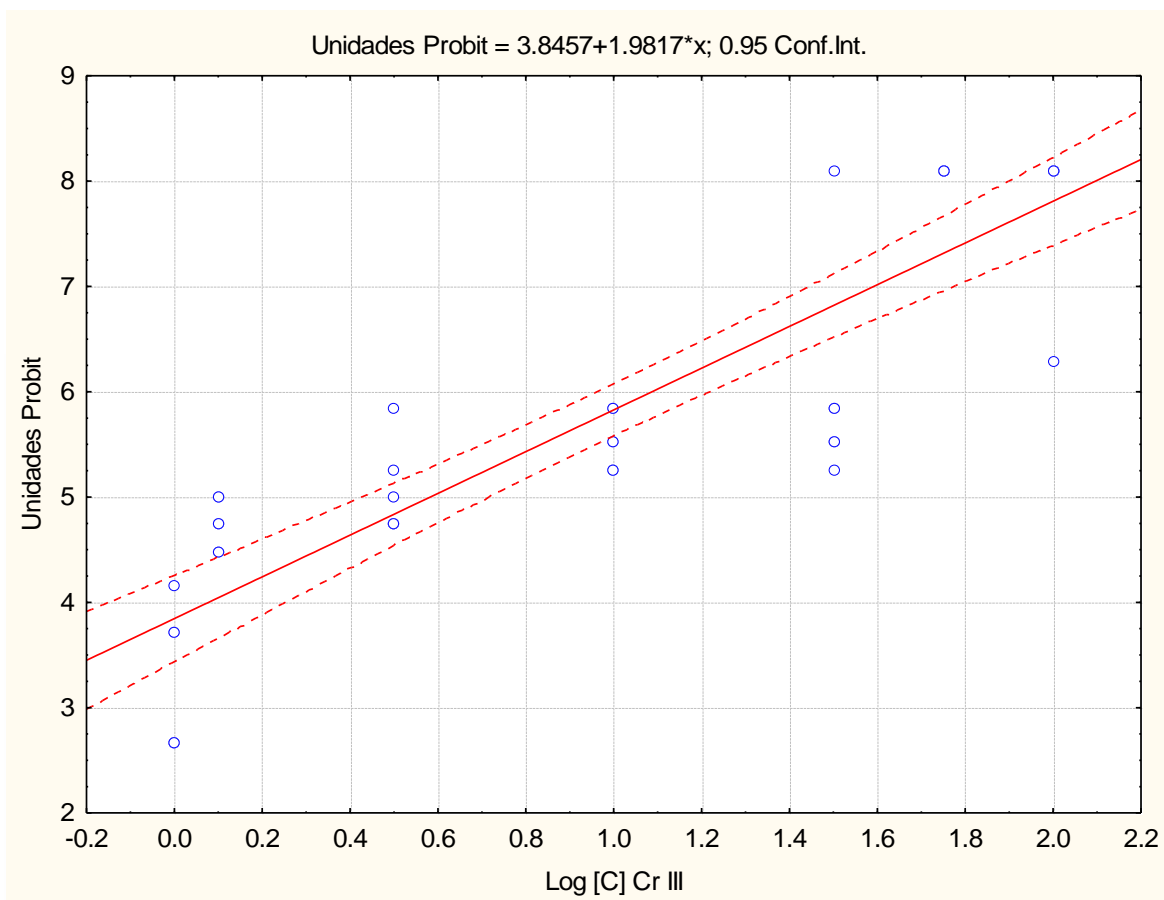


Figura 3. Regresión lineal del Cromo III, *Brachionus calyciflorus* cepa San Pancho.

En el eje de las ordenadas, las unidades probit, representan la mortalidad de los organismos y en el eje de las abscisas el logaritmo de la concentración es representado en mg/ L.

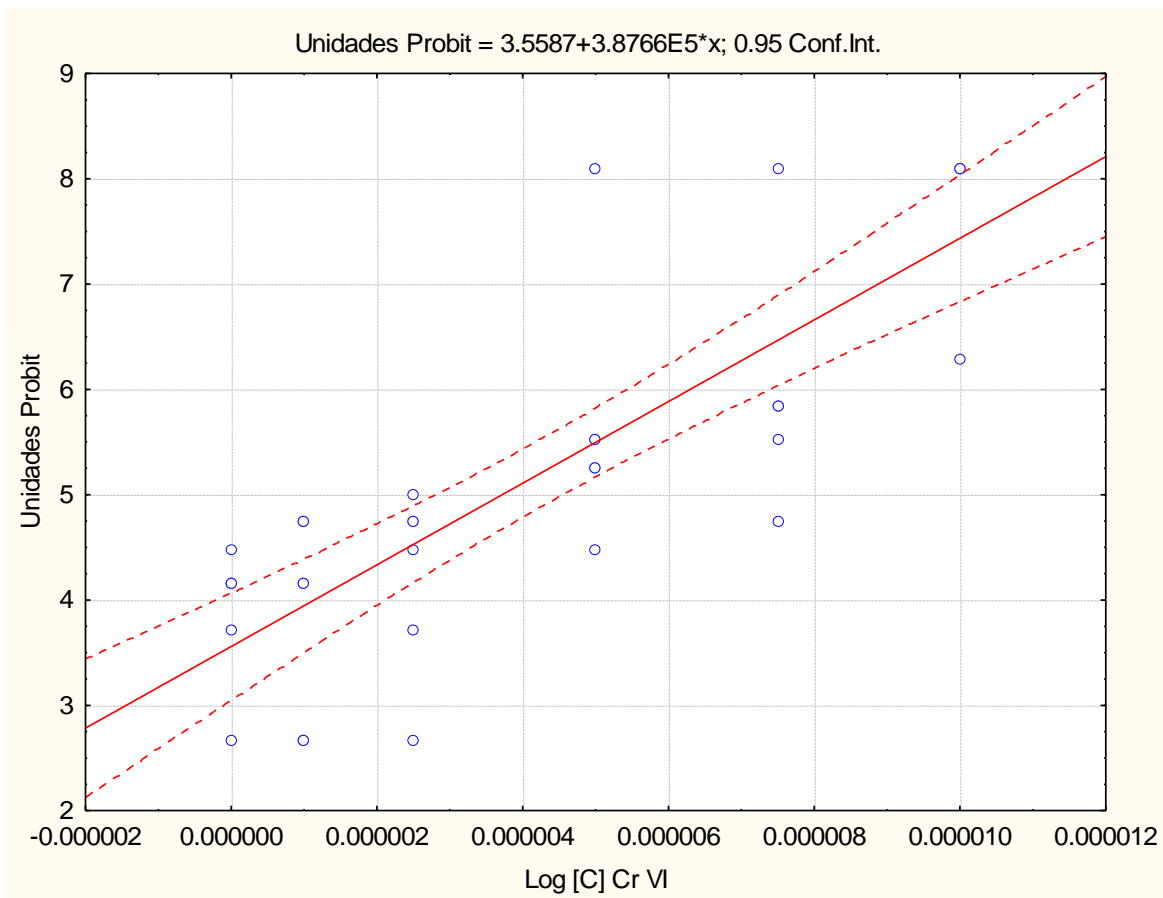


Figura 4. Regresión lineal del Cromo VI, *Brachionus calyciflorus* cepa San Pancho.

En el eje de las ordenadas, las unidades probit, representan la mortalidad de los organismos y en el eje de las abscisas el logaritmo de la concentración es representado en mg/ L.

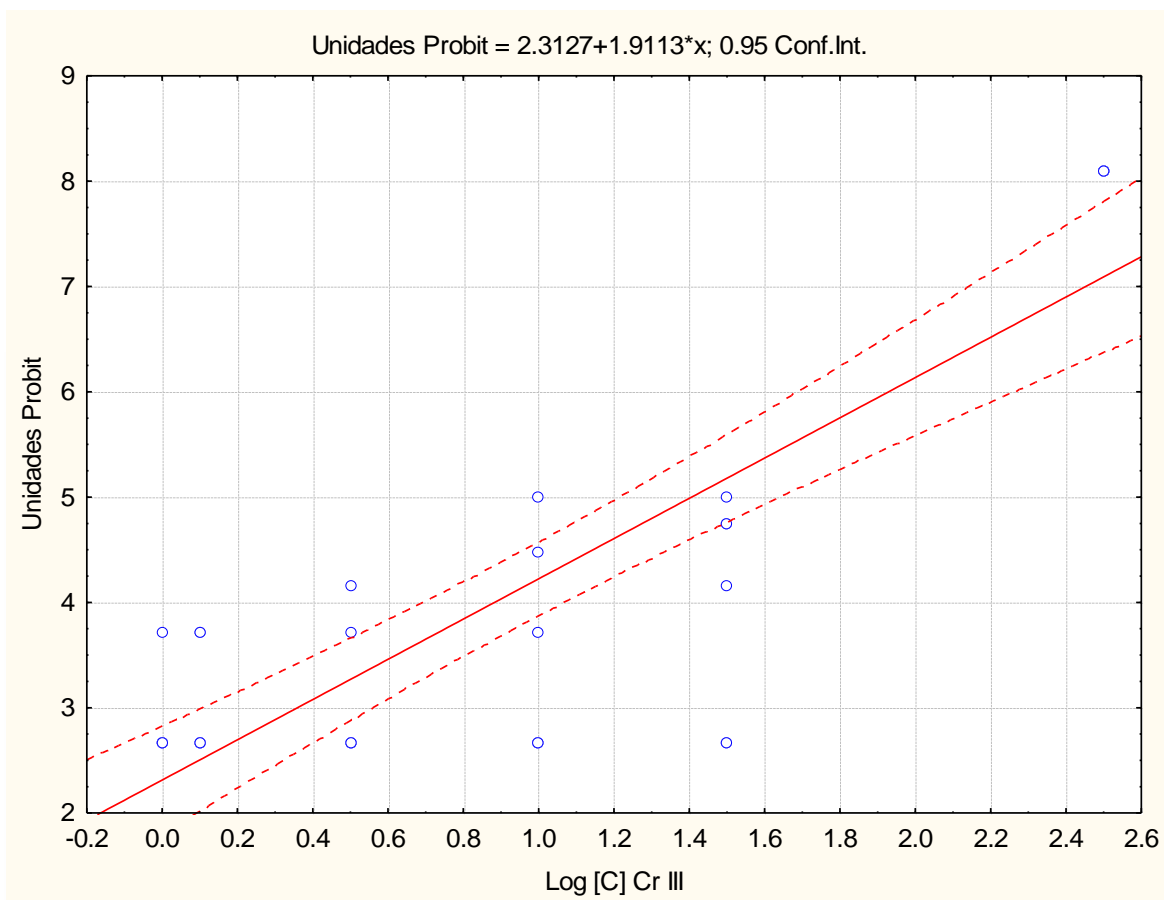


Figura 5. Regresión lineal del Cromo III *Lecane quadridentata*.

En el eje de las ordenadas, las unidades probit, representan la mortalidad de los organismos y en el eje de las abscisas el logaritmo de la concentración es representado en mg/ L.

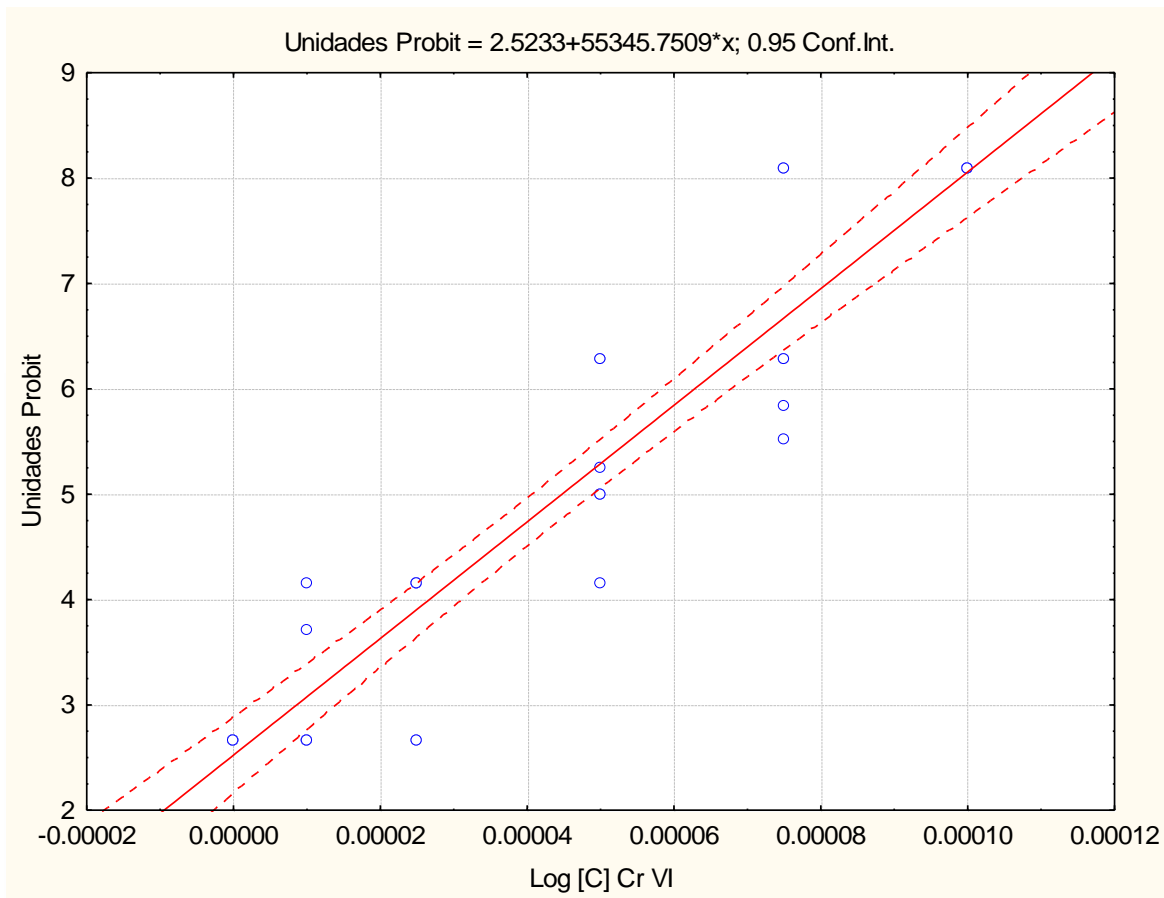


Figura 6. Regresión lineal del Cromo VI, *Lecane quadridentata*.

En el eje de las ordenadas, las unidades probit, representan la mortalidad de los organismos y en el eje de las abscisas el logaritmo de la concentración es representado en mg/ L.

5.2 Detección de metalotioneínas en rotíferos *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridentata*.

Se analizó la morfología de *Lecane quadridentata* y *Brachionus calyciflorus* para la detección de metalotioneínas. En la Figura 7 se muestran los inmuno-metalopatronos para cada especie. Estructuras mecano- receptoras como la corona, pie y espinas, están últimas sólo en el caso de *Brachionus calyciflorus*.

En la Figura 7A, se muestra un esquema general de las estructuras internas del rotífero *Brachionus calyciflorus*. En la Figura 7B, se indican los órganos internos de *Brachionus calyciflorus* control. En la Figura 7C se indican las secciones con inmunoreactividad, involucrando corona de cilios (apr), cerebro (ce) y saco cerebral (sc), mástax (m), estómago (es) y vitelario (v).

La Figura 7D, es un esquema de *Lecane quadridentata*, indicando las estructuras internas. En la Figura 7E, se observan los principales órganos internos de *Lecane quadridentata* control. En la Figura 7F, se indican las secciones en donde se observó inmunoreactividad como el mástax (m), ovario (ov), estómago (st) y ganglio cerebral (bg).

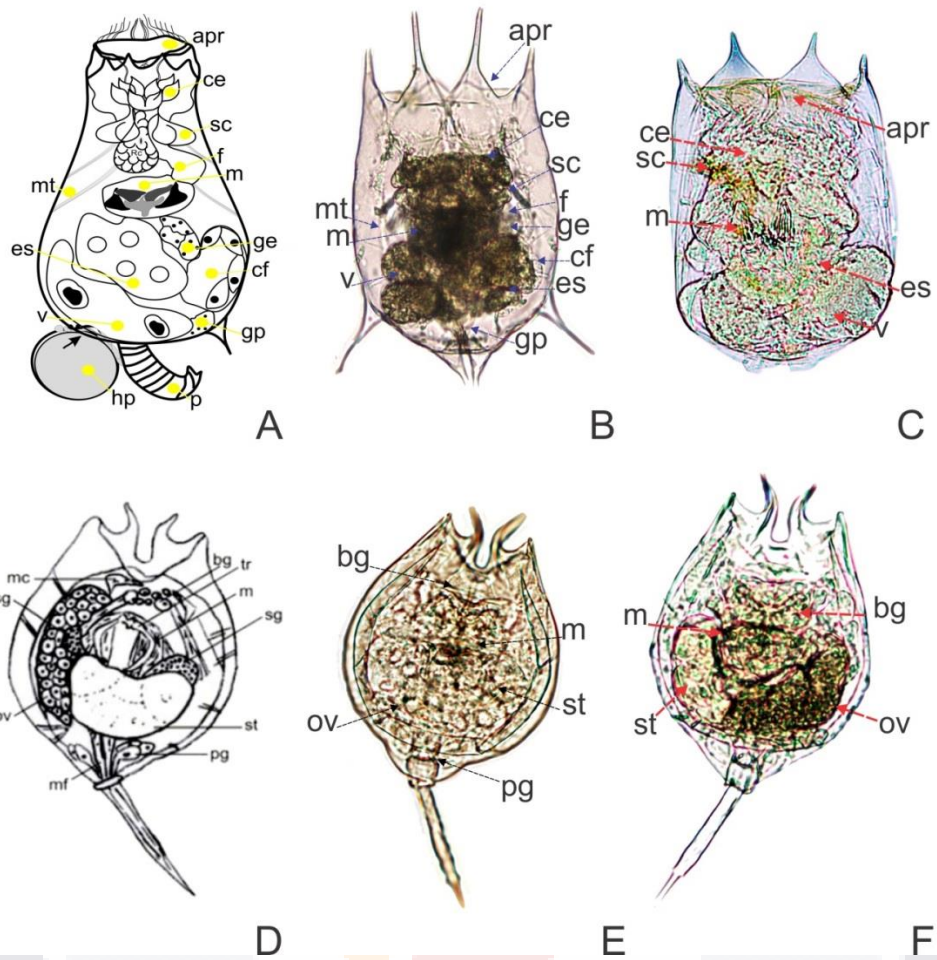


Figura 7. Inmuno metalo patrones de rotíferos *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridentata*.

A *Brachionus calyciflorus*. Abreviaturas: Corona de cilios (apr), Cerebro (ce), Saco cerebral (sc), Faringe (f), Mástax (m), el trofi es la estructura dentro, Músculos transversales (mt), Glándula estomacal (ge), Células flama (cf), Vitelario (v), Glándula del pie (gp), Huevo partenogenético (hp), Pie (p). (Ref. Alvarado Flores, 2011). **B** (Control positivo) y **C** (Control negativo). Patrones de detección de metalotioneinas identificados en *Brachionus calyciflorus*.

D *Lecane quadridentata*. Abreviaturas: Músculos de la corona (mc), Glándula Salivar (sg), Ovario (ov), Músculo del pie (mf), Glándula pedal (pg), Estómago (st), Mástax, Trofi (tr), Ganglio cerebral (bg) (Ref. Perez-Legaspi *et al.*, 2008).

E (Control positivo) y **F** (Control negativo). Patrones de detección de metalotioneínas para *Lecane quadridentata*.

La Figura 8 nos muestra los resultados de los experimentos sobre la expresión de las metalotioneínas en ambas especies de rotíferos después de ser expuestas a las dos especies químicas de cromo. La figura **8A** que muestra los órganos internos de *Brachionus calyciflorus* control negativo, sirve como referencia para comparar la inmunoreactividad en *Brachionus calyciflorus* que fueron intoxicados con Cromo Trivalente (Cr III), las flechas indican la zona donde se observó reacción principalmente en la región de la corona de cilios (apr) figuras **8B** y **8C**.

La Figura **8D**, de *Lecane quadridentata* control negativo, nos sirve como referencia para identificar los sitios en los que se presentó reacción en organismos intoxicados con Cromo Trivalente (Cr III), involucrándose la zona del ganglio cerebral (bg), figura **8E** y siendo esta misma zona más significativa en *Lecane quadridentata*, en organismos intoxicados con Cromo Hexavalente (Cr VI), figura **8F**.

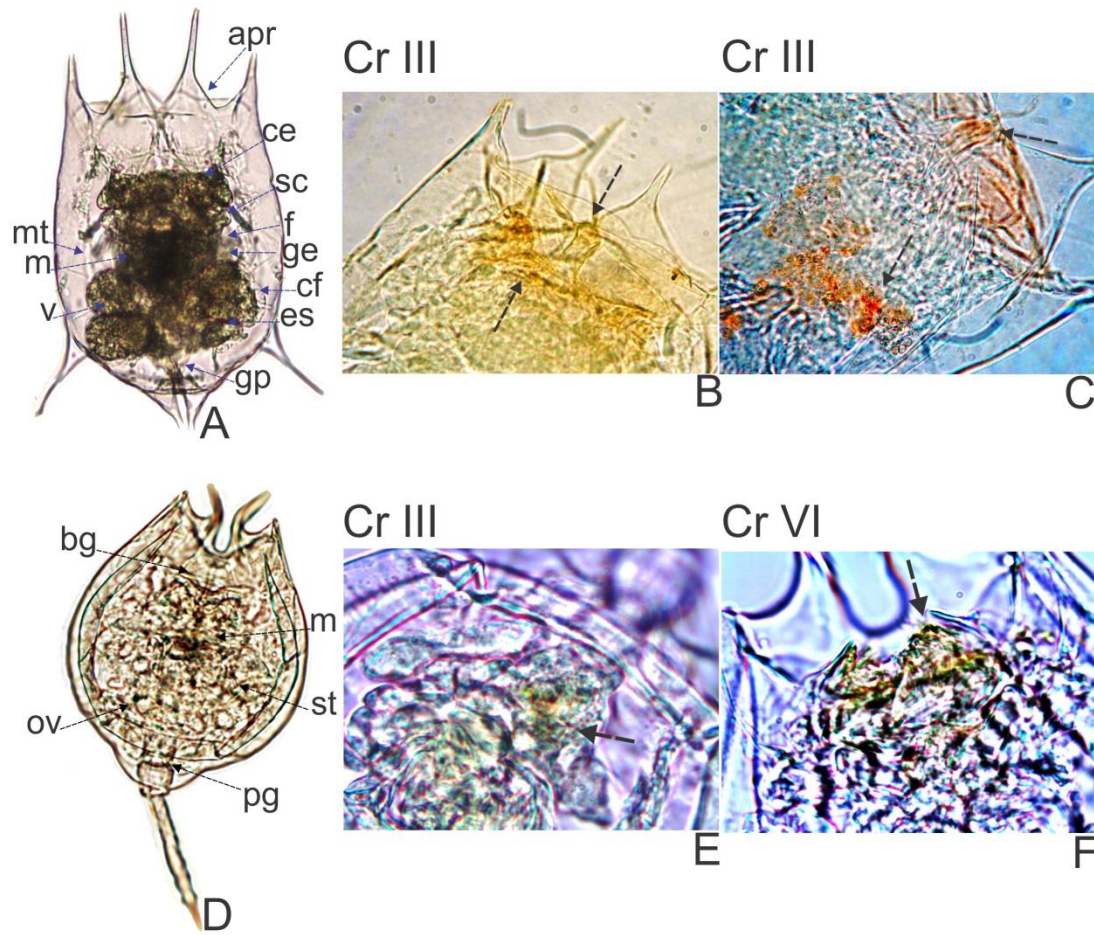
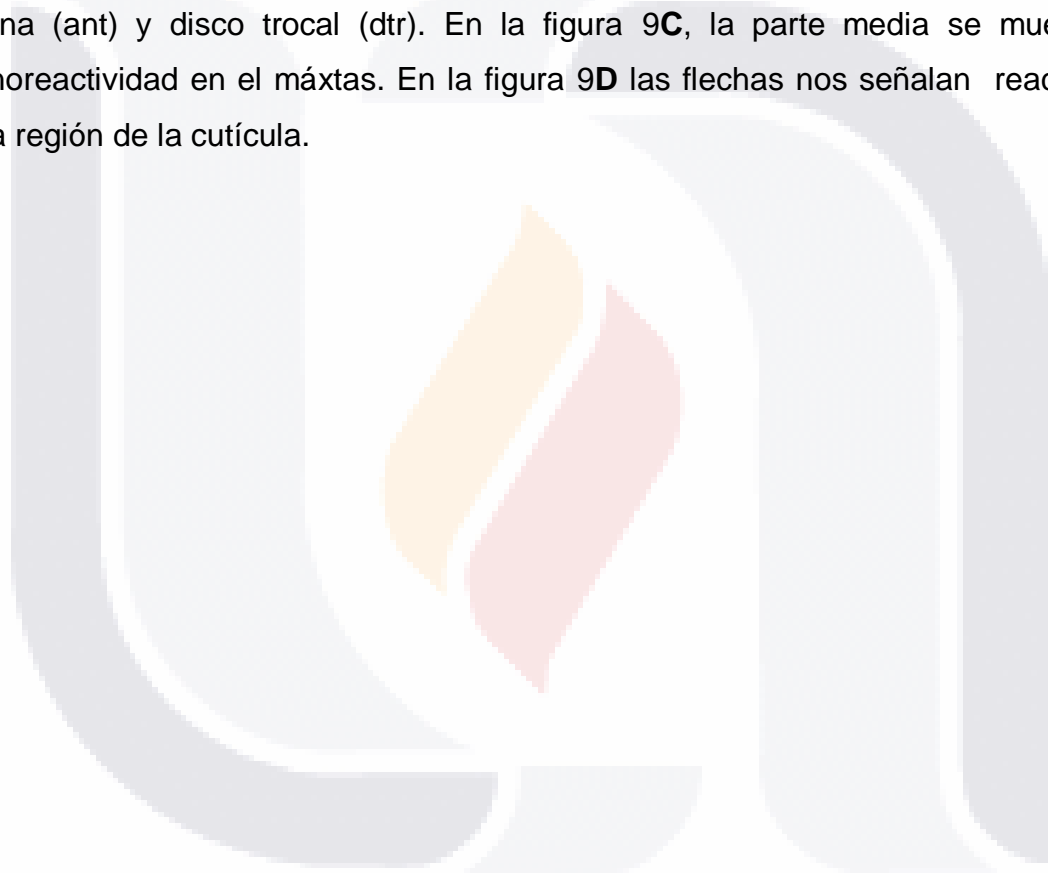


Figura 8. Expresión de Metalotioneínas en *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridentata*, intoxicados con Cr III y Cr VI.

B, C *Brachionus calyciflorus*, organismos intoxicados con Cromo Trivalente. **E** *Lecane quadridentata* organismos Intoxicados con Cromo Trivalente (Cr III). **F** *Lecane quadridentata* organismos Intoxicados con Cromo Hexavalente (Cr VI).

Abreviaturas: Ganglio cerebral (bg), máxtas (m), glándulas salivares (sg), ovario (ov), músculo del pie (mf), glándula pedal (pg), músculos de la corona (mc), músculos del trofi (mt), músculos retráctiles (rm), estómago (st), vitelario (v). (Ref. Perez-Legaspi *et al.*, 2008).

La Figura 9 nos muestra los patrones de detección y las principales zonas en la que se observó inmunoreactividad de Metalotioneínas, en *Brachionus calyciflorus*, en organismos intoxicados con Cr III. En la figura **9A** se destacan tres principales zonas: en la parte superior, la zona de la cabeza; en la parte media del máxtas-cerebro y en la parte inferior del microorganismo, la zona desde el estómago hasta el vitelario. Las flechas indican los sitios específicos de las principales zonas donde se observó inmunoreactividad. En la figura **9B** que corresponde a la zona de la cabeza, se muestra reacción en regiones como la corona de cillios (apr), antena (ant) y disco trocal (dtr). En la figura **9C**, la parte media se muestra inmnoreactividad en el máxtas. En la figura **9D** las flechas nos señalan reacción en la región de la cutícula.



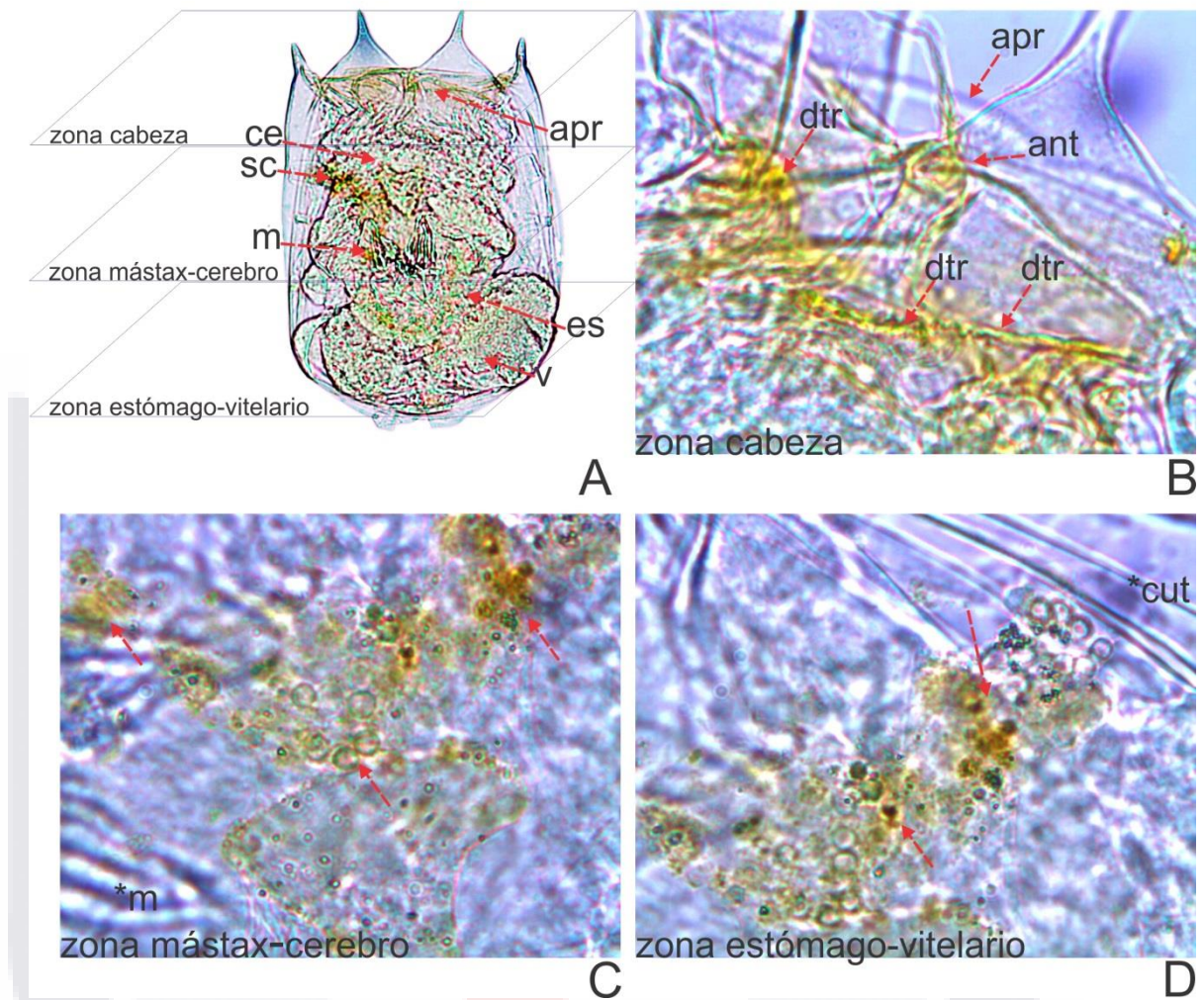


Figura 9. Patrones de detección de Metalotioneínas en *Brachionus calyciflorus*.

Abreviaturas: **A.** Cerebro (ce), Saco cerebral (sc), Mástax (m, *m), Corona de cilios (apr), Estómago (es), Vitelario (v), Disco trocal (dtr), antena (ant), cutícula (cut, *cut). (Ref. Alvarado Flores, 2011).

La Figura 10 nos muestra los patrones de detección de metalotioneínas en *Lecane quadridentata* y las principales zonas de inmunoreactividad de organismos intoxicados con Cr VI. La Figura 10A, muestra las principales zonas *Lecane quadridentata*: en la parte superior la zona de la cabeza, en la parte media, la zona

del máxtas y cerebro; y en la parte inferior, el estómago y vitelario. En la Figura 10B la flecha indica la región del músculo de la corona donde se observó reacción.

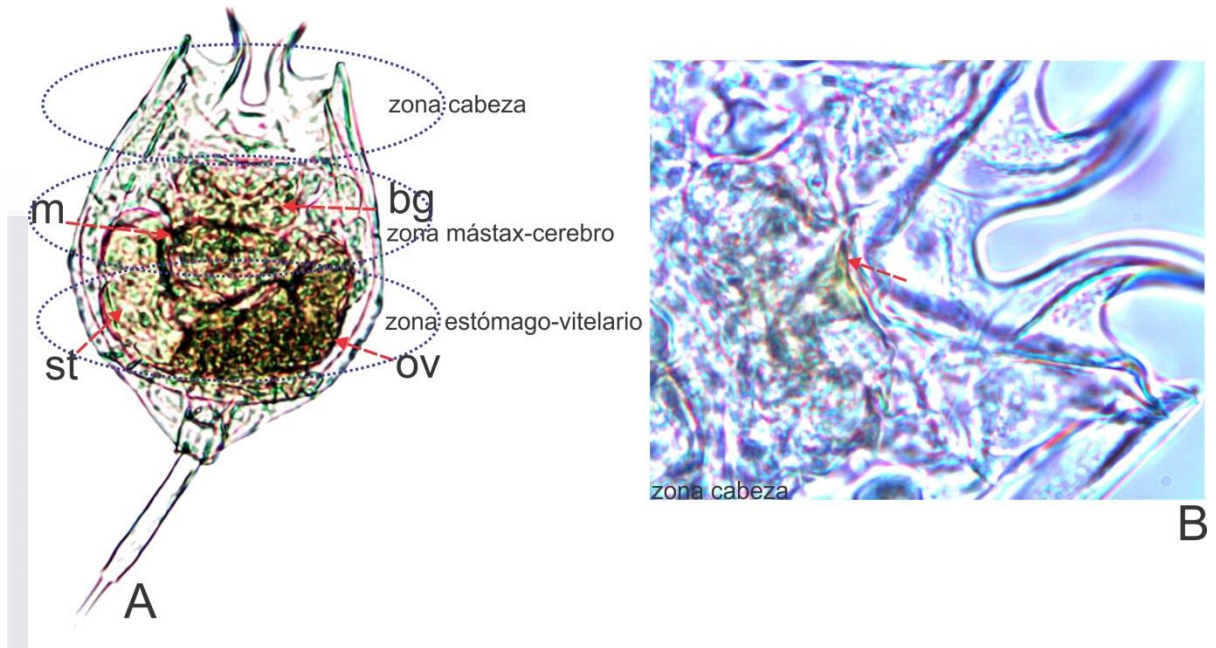


Figura 10. Patrones de detección de metalotioneinas en *Lecane quadridentata*.

Abreviaturas: Ganglio cerebral (bg), máxtas (m), ovario (ov), estómago (st). (Ref. Perez-Legaspi *et al.*, 2008).

5.3 Efecto del Cromo trivalente y hexavalente en la composición elemental de los rotíferos en un análisis de rayos X en microscopía electrónica de barrido.

En el análisis de la composición elemental de estructuras externas de los rotíferos *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridentata* por medio de dispersión de rayos X en microscopía electrónica de barrido. Se detectan principalmente carbono (C), oxígeno (O), calcio (Ca), silicio (Si) y aluminio (Cu), en organismos control.

En los rotíferos intoxicados además de los principales elementos, se detecta la presencia del Cr tanto para los intoxicados con cromo trivalente como para los intoxicados con cromo hexavalente, cuando se expone al rotífero al tóxico, por 24 horas con la CL_{50} , una concentración superior y una inferior (LC 95%), respectivamente (Ver anexo C). La Figura 11, muestra el control de *Lecane quadridentata*, en el que no se detectó ninguna de las dos especies de cromo. Las imágenes reflejan los elementos detectados, con un rango de penetración de los rayos X de 1000nm. Se eligieron sitios de interés como la cutícula y la zona de la cabeza y pie. El espectro de esta figura muestra los principales elementos encontrados.

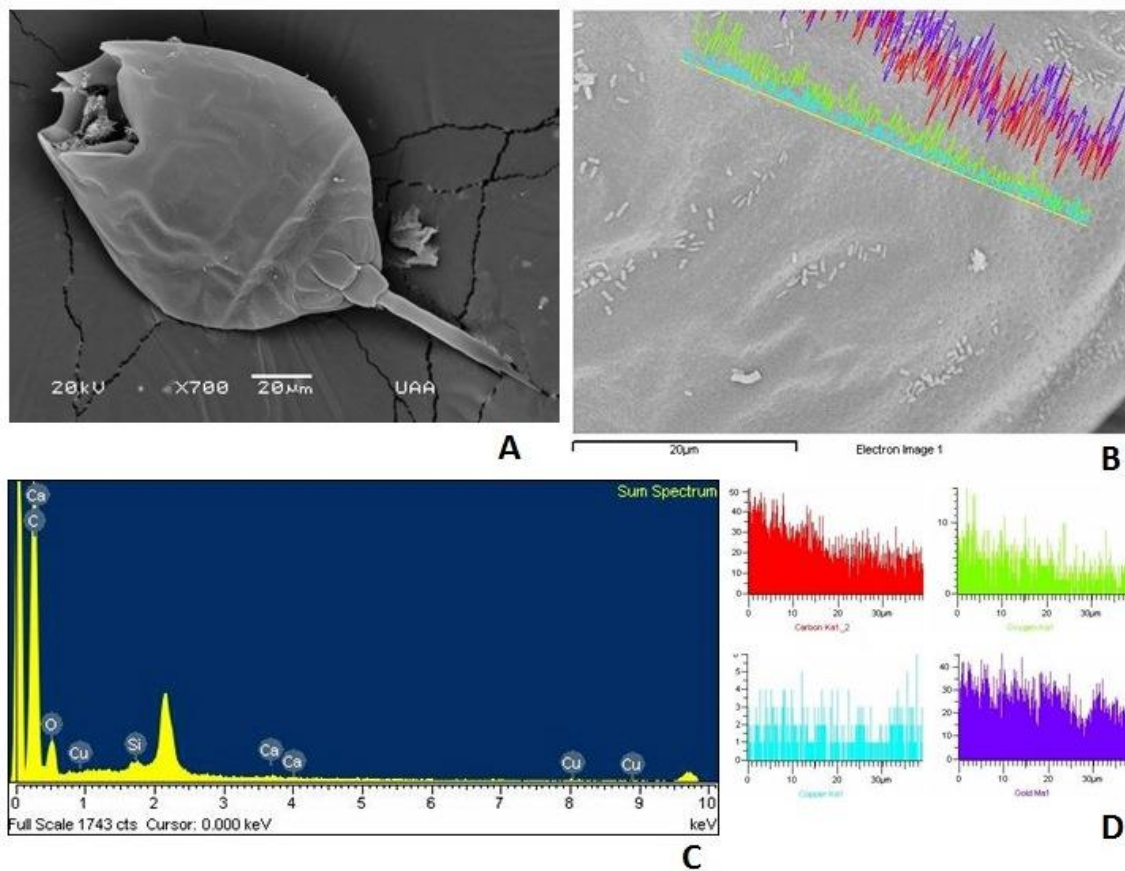


Figura 11. Composición elemental (Control) para *Lecane quadridentata*.

En la Figura 12, se representa en el espectro el análisis cuantitativo en el que las muestras de rotíferos *Lecane quadridentata* intoxicados con cromo trivalente emitieron fotones suficientes para detectar la presencia de este metal.

Cualitativamente las imágenes muestran la lóriga de *Lecane quadridentata* con un aspecto liso, principalmente en la zona donde se detectó el cromo trivalente.

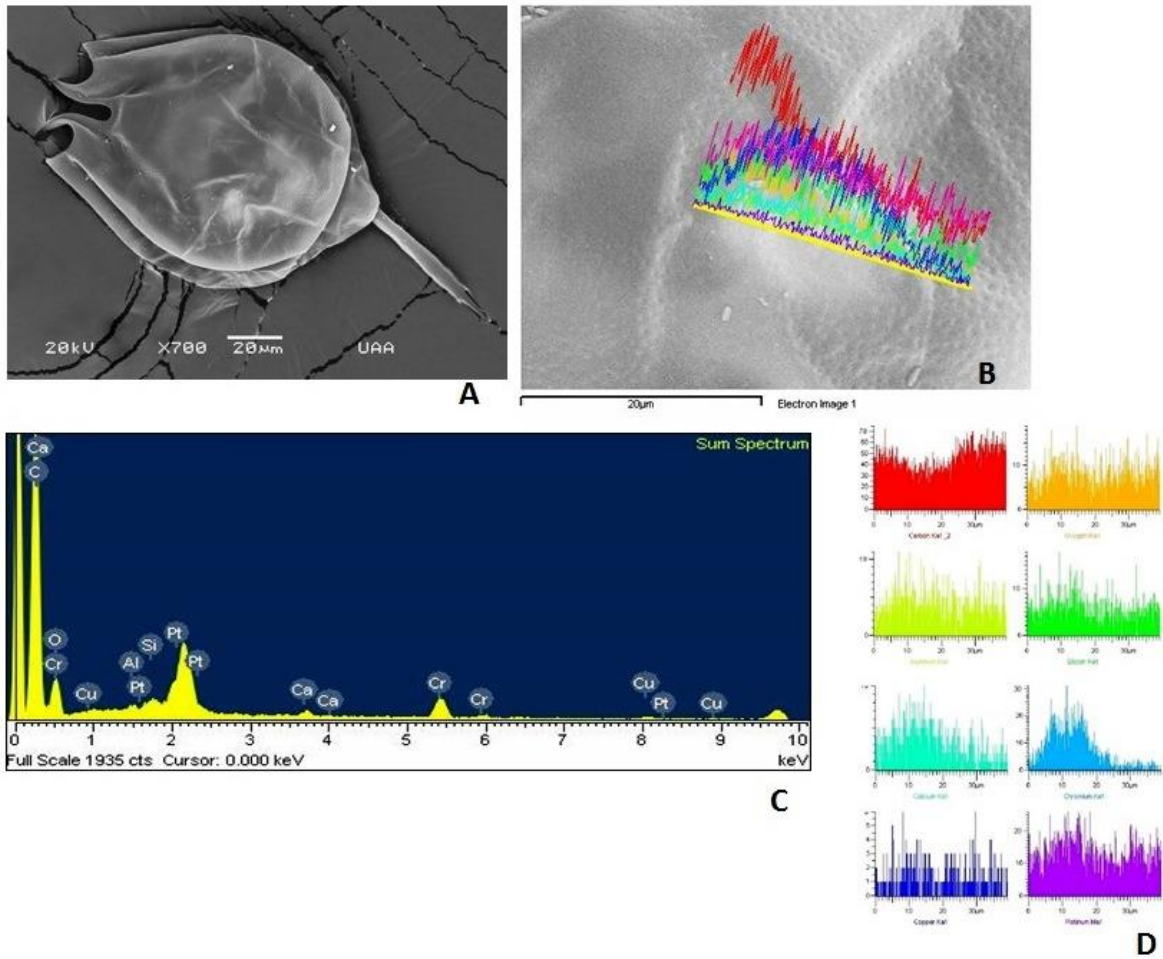


Figura 12. Composición elemental Cr III [CL₅₀] para *Lecane quadridentata*.

La Figura 13, muestra los resultados cualitativos y cuantitativos de rotíferos *Lecane quadridentata* intoxicados con cromo hexavalente el cual se detectó como se puede observar en el espectro. Las regiones de análisis fueron la zona de la cabeza y cutícula.

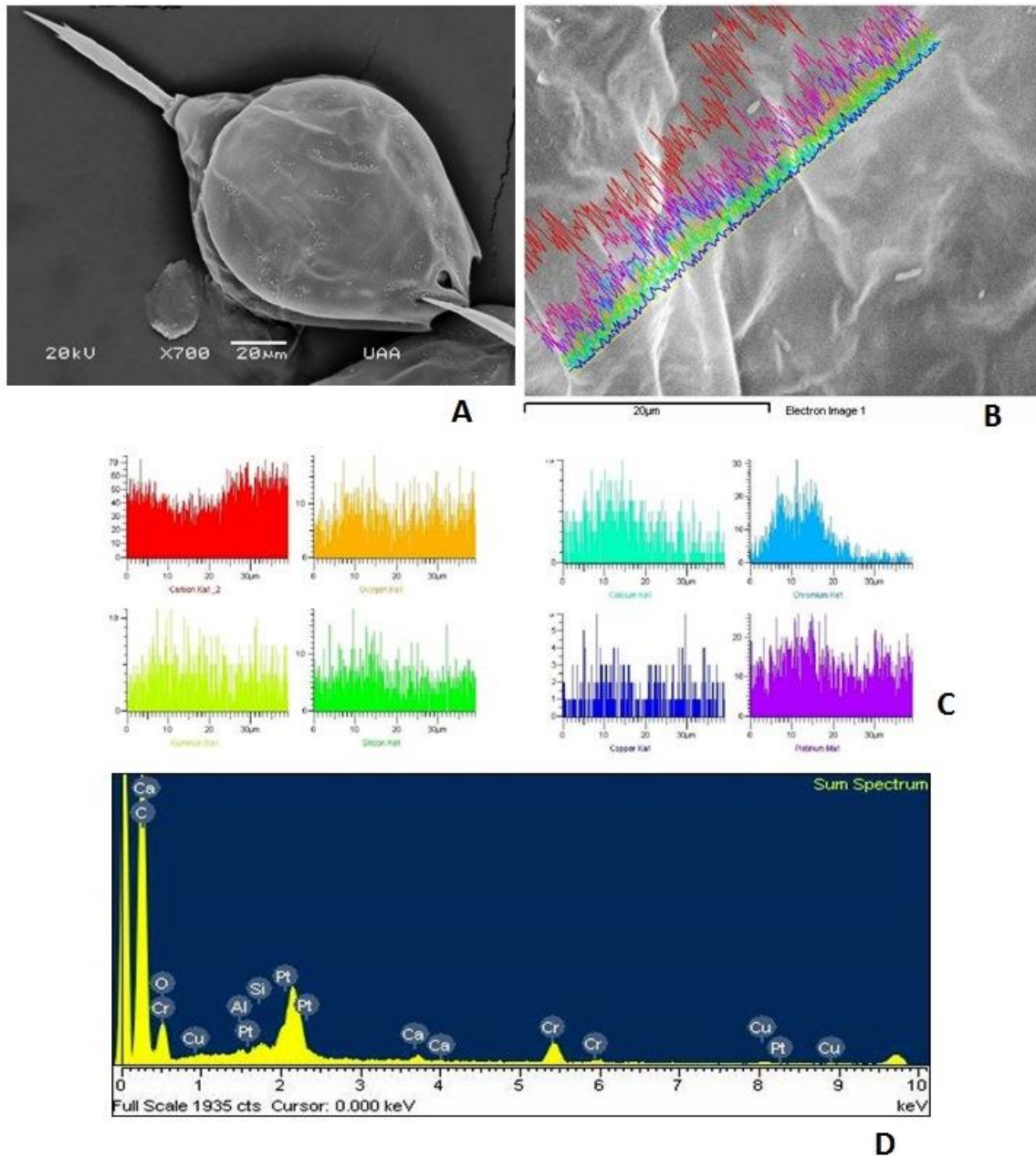


Figura 13. Composición elemental Cr VI [CL₅₀] para *Lecane quadridentata*.

Las Figuras 14 y 15, muestran la detección de cromo tanto trivalente como hexavalente en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. En los espectros se pueden observar claramente los picos de cromo. En las imágenes se observa lóriga de *Brachionus calyciflorus* deteriorada.

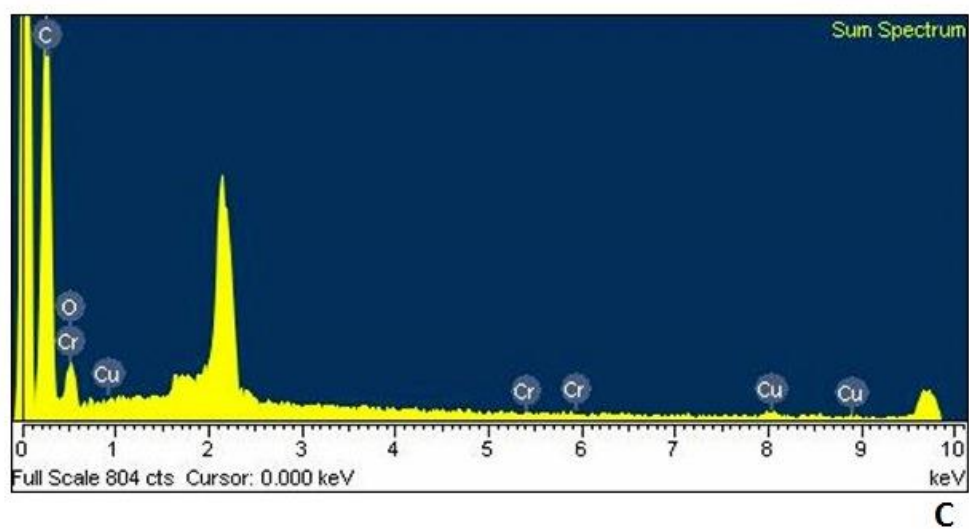
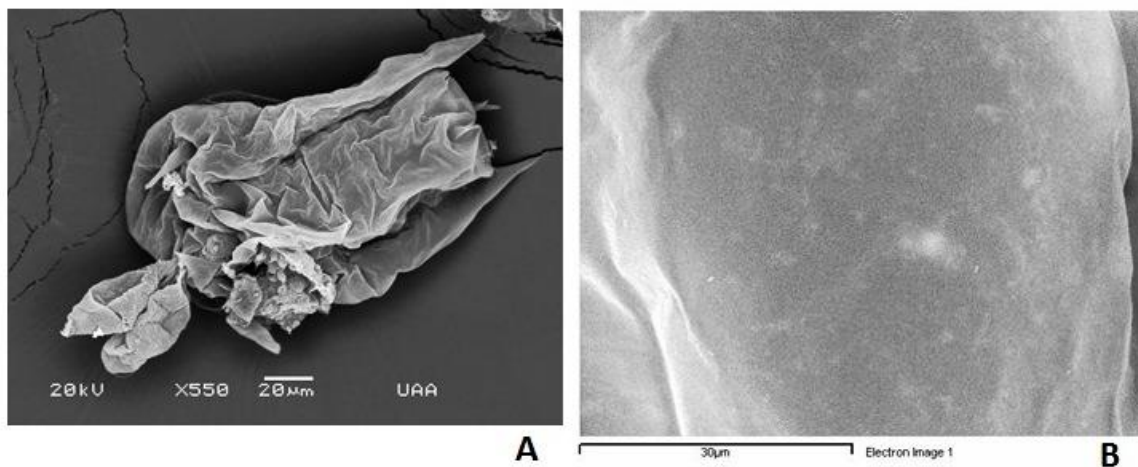
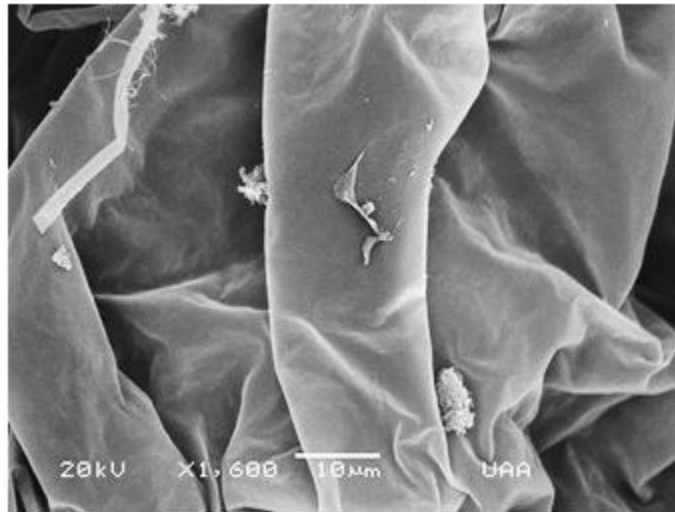
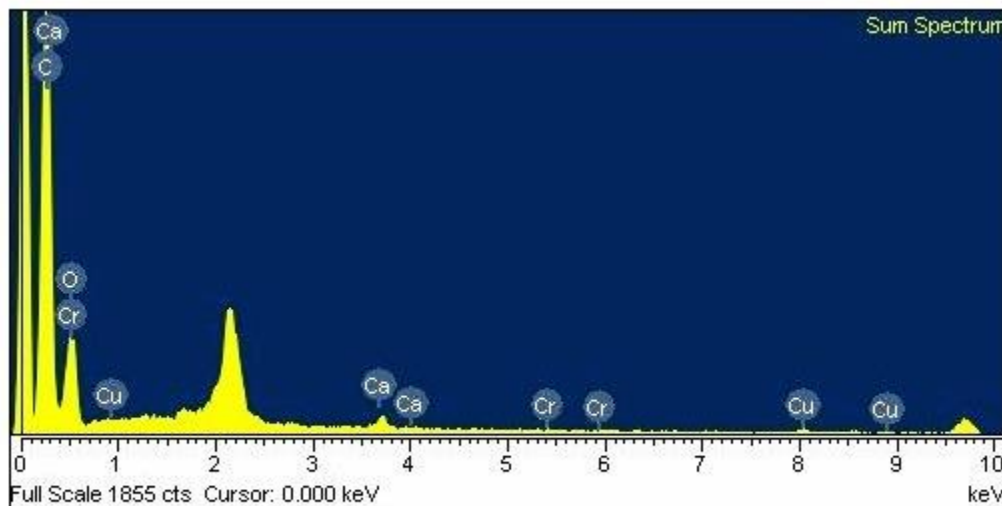


Figura 14. Composición elemental Cr III [CL₅₀] para *B.C. Gainesville*.



A



B

Figura 15. Composición elemental Cr VI [CL₅₀] para *B.C. Gainesville*.

El resumen de la composición elemental de todas las muestras (control e intoxicados), con las diferentes concentraciones: CL₅₀, una concentración superior y una inferior (LC 95%), respectivamente (ver anexo D). Considerando aquellas en las que se detectó mayor porcentaje de cromo trivalente y hexavalente en cada una de las especies de rotíferos, intoxicados por 24 h se muestra en los siguientes histogramas (Figuras 16 a 19).

La Figura 16, representa la composición elemental de organismos control del rotífero únicamente para *Lecane quadridentata*, en donde no se observa la presencia de cromo.

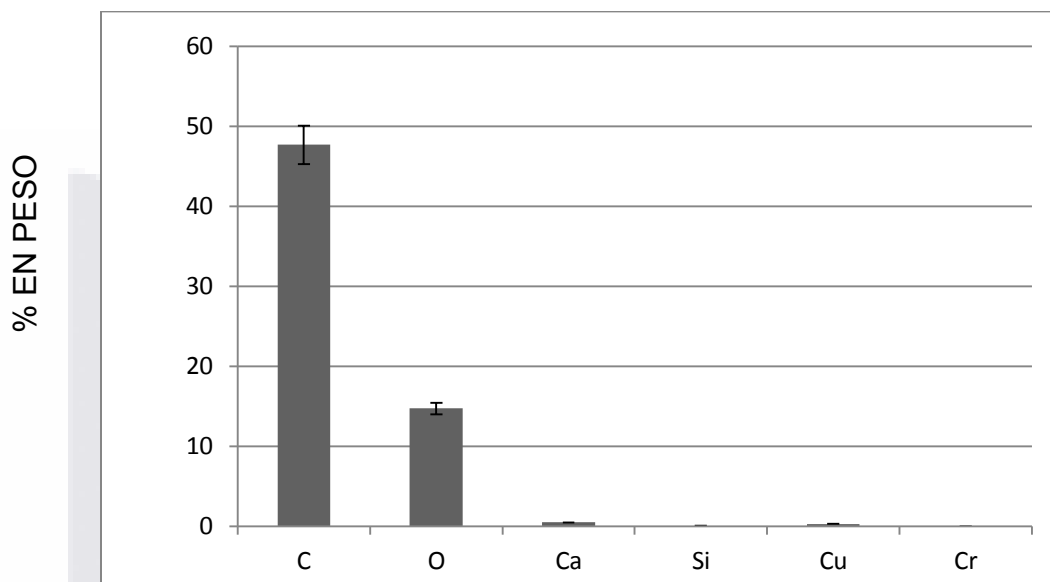


Figura 16. Composición elemental Control (M1). Media \pm desviación estándar, para *Lecane quadridentata*. N = 4.

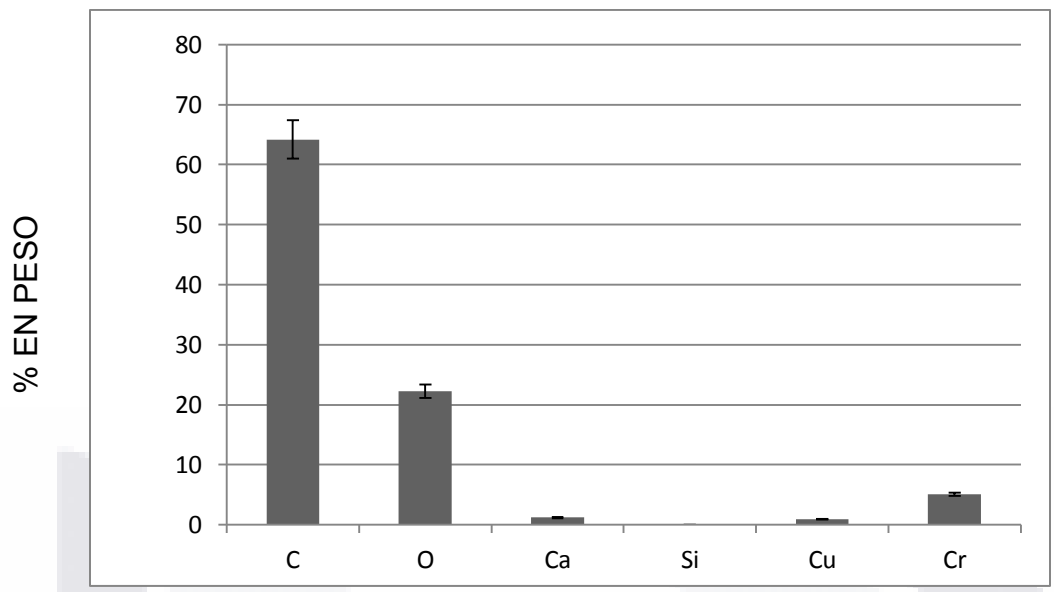


Figura 17. Composición elemental de Cromo III % en peso= 5.073 %, para *Lecane quadridentata*, usando la CL₅₀ (M2). Media ± desviación estándar. N = 6.

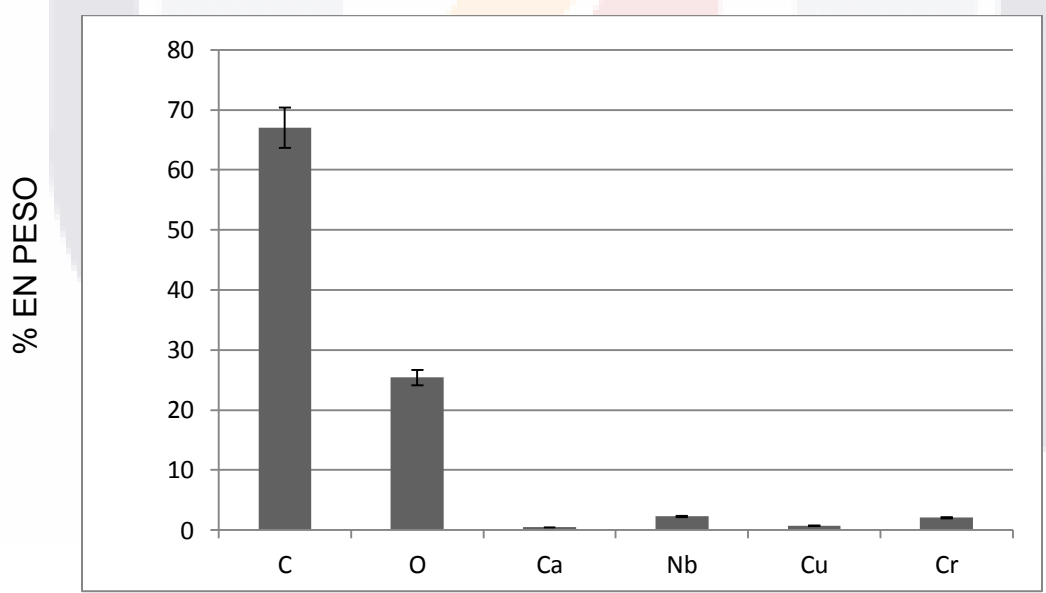


Figura 18. Composición elemental de Cromo VI % en peso= 2.254 % usando la CL₅₀ (M5), para *Lecane quadridentata*. Media ± desviación estándar. N = 6.

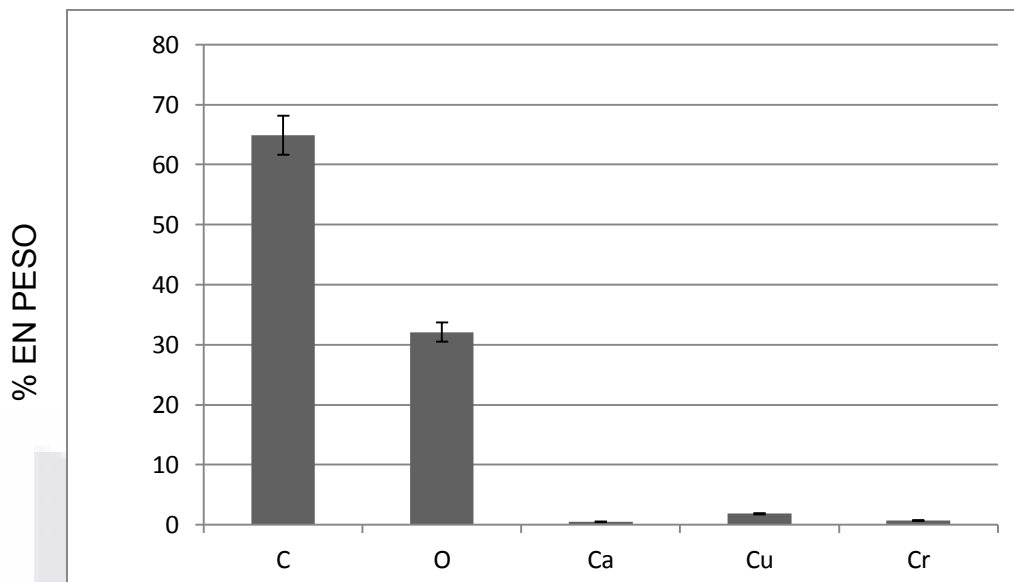


Figura 19. Composición elemental de Cromo III, %= 0.706, usando el límite superior a la CL₅₀ (M10), para *B.C. Gainesville*. Media ± desviación estándar, N= 6.

5.4 Monitoreo de cromo III y VI en los rotíferos *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridendata* por espectrofotometría de absorción atómica.

El análisis del cromo trivalente y cromo hexavalente, y los resultados del cálculo del factor de bioconcentración (FBC), cuando los rotíferos son intoxicados por 24 horas con la CL₅₀, se observan en las siguientes Figuras (Ver Figuras 20 y 21). Bioconcentra en promedio hasta 600 veces el cromo III y hasta 4 millones de veces el cromo VI, en ambas especies de rotíferos.

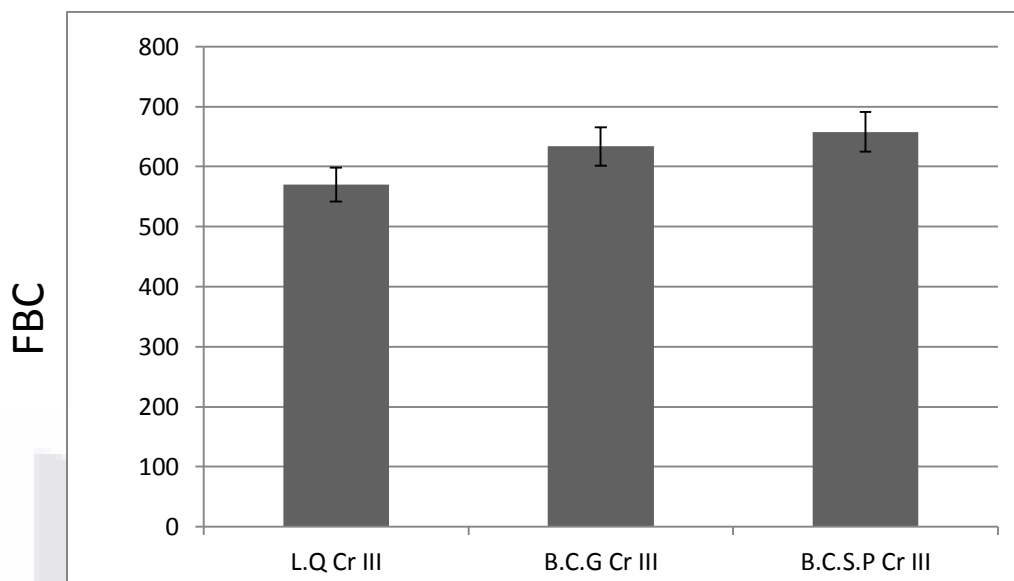


Figura 20. Factores de Bioconcentración con Cr III para cada especie. Media \pm desviación estándar. *Lecane quadridendata* $FBC_{Cr III} = 569.899217$, $N = 200$; *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville $FBC_{Cr III} = 633.410357$, $N=100$; *Brachionus calyciflorus* cepa San Pancho $FBC_{Cr III} = 657.680861$, $N=100$.

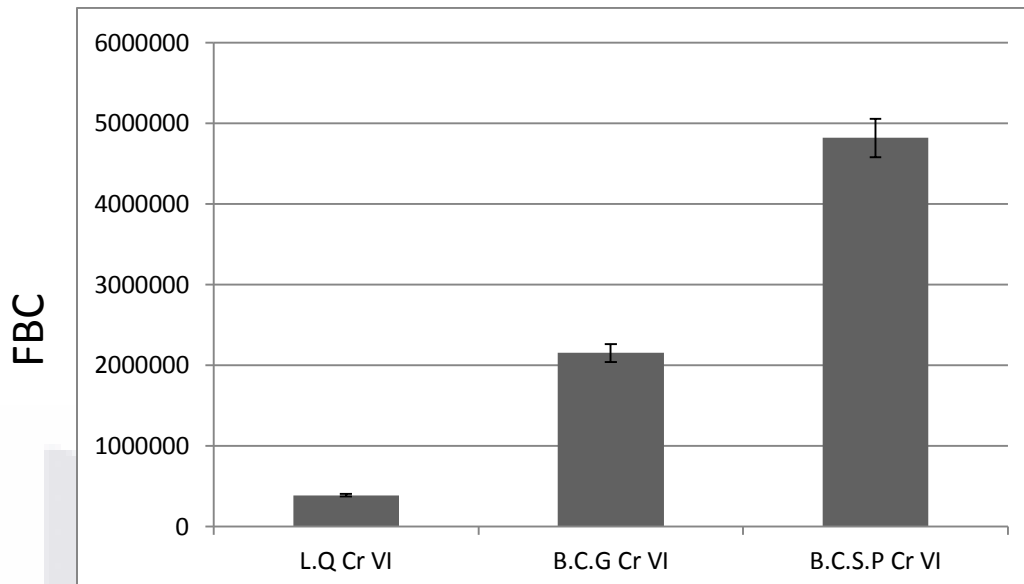


Figura 21. Factores de Bioconcentración con Cr VI para cada especie. Media \pm desviación estándar. Para *Lecane quadridendata* $FBC_{Cr VI} = 386485.855$; *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville $FBC_{Cr VI} = 2149587.91$; *Brachionus calyciflorus* cepa San $FBC_{Cr VI} = 4817765.57$.

6. Discusiones.

6.1 Concentraciones Letales Medias de Cromo en especies acuáticas.

Los resultados demostraron que ambas especies de rotíferos *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridendata*, expuestos a un metal tóxico, el Cr (VI) a muy bajas concentraciones: $CL_{50} = 4 \times 10^{-6}$ mg/L y $CL_{50} = 4.7 \times 10^{-5}$ mg/L, respectivamente, indujo efectos letales agudos. Como se resume en el Cuadro 3 y se observa en las Figuras 1 a 6. Siendo *Lecane quadridendata* diez veces más resistente a este tóxico. El análisis de las concentraciones letales medias, corroboran mayor resistencia de ambas especies al cromo Trivalente con $CL_{50} = 1.051$ mg/L para *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville, $CL_{50} = 0.64$ mg/L para *Brachionus calyciflorus* cepa San Pancho y $CL_{50} = 1.279$ mg/L, para *Lecane quadridendata*. Martínez-Jerónimo, et al. (2008), reporta también valores bajos con el tóxico cromo hexavalente para el cladóceros *Daphnia exilis*, la CL_{50} determinada a 48 horas fue de 0.1170 ± 0.0068 y 0.0802 ± 0.0057 mg/L, respectivamente a 20 y 25 °C. Velandia Guauque, et al. (2010), determinó una CL_{50} a las 48 horas de 0.13 mg/L, en el cladóceros *Daphnia pulex*, con cromo hexavalente. Así como se han reportado estudios en especies zooplanctónicas, también se reportan análisis de cromo en peces, Vera-Candioti, et al. (2011), evaluó la toxicidad aguda de Cr VI en madrecitas de agua, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns 1842), pez ovovivíparo de amplia distribución neotropical, los resultados mostraron que la CL_{50} alcanzó valores de 35.1, 27.5, 24.0 y 21.4 mg/L luego de 24, 48, 72 y 96 horas de exposición, respectivamente.

Los estudios realizados por Pérez Legaspi y Rico Martínez (2001) con Cromo en tres especies de *Lecane*. Los cuales reportan valores para *Lecane quadridendata* $CL_{50} = 4.50$ mg/L; *Lecane hamata* $CL_{50} = 3.21$ mg/L y para *Lecane luna* $CL_{50} = 3.26$ mg/L, a 48hrs de exposición al tóxico, son mayores a nuestros resultados y esto se puede atribuir a la diferencia entre una medición de cromo total y a las mediciones del cromo trivalente y el cromo hexavalente, que utilizamos por separado.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los resultados obtenidos en nuestros estudios en general, son menores a los reportados en otras especies zooplanctónicas, lo cual se puede atribuir a mayor susceptibilidad por parte de estas especies. Otro factor importante es la talla de los organismos que influye en el manejo de los neonatos, que es la fase de desarrollo que usualmente se emplea en los estudios y permite seleccionarlos como organismos de prueba, lo cual los convierte en modelos de biomarcadores para estudios de toxicidad.

6.2 Bioacumulación del Cromo Hexavalente y Cromo Trivalente en *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridendata*.

Nuestros resultados corroboraron la hipótesis. El cromo en sus dos estados de transición (III y VI) fue bioconcentrado en ambas especies de rotíferos y en ambas causó efectos adversos.

En lo que respecta a bioacumulación, el parámetro indicador de la Bioacumulación, es el Factor de Bioconcentración (FBC). El proceso de bioacumulación en los organismos acuáticos se expresa típicamente mediante las proporciones de las concentraciones químicas en el tejido del organismo (por lo general en todo el cuerpo), en relación con las concentraciones de exposición. Sin embargo, se ha demostrado que los FBC suelen ser muy variables entre los organismos y, en general inversamente proporcional a la concentración de exposición. Estos son determinados en campo y laboratorio (donde fueron simuladas las cadenas alimentarias). Existe una relación inversamente proporcional en cuanto a las concentraciones de exposición en la obtención de los FBC de campo y laboratorio, siendo frecuentemente 100-1000 veces mayor los FBC en las especies, que la concentración de metales en campo, esto se atribuye a los dos niveles de exposición (consumidores primarios y secundarios) y la inclusión de la exposición alimentaria. Teniendo implicaciones importantes para las regulaciones ambientales y la utilización de datos de bioacumulación de

metales en evaluaciones ambientales de sitios específicos, tales como evaluaciones de riesgo ecológico y salud humana (De Forest et al., 2007).

Los resultados en laboratorio para la obtención del FBC, en las dos especies de rotíferos, fueron altos principalmente con la forma más tóxica de Cromo (Cr VI). Los valores obtenidos (*Lecane quadridendata* $FBC_{Cr\ III} = 569.90$, $FBC_{Cr\ VI} = 386,485.86$; *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville $FBC_{Cr\ III} = 633.41$, $FBC_{Cr\ VI} = 2,149,587.91$; *Brachionus calyciflorus* cepa San Pancho $FBC_{Cr\ III} = 657.68$, $FBC_{Cr\ VI} = 4,817,765.57$), demuestran la bioconcentración en promedio de 600 veces con el Cr III y hasta 4 millones de veces el Cr VI, en las dos especies de rotíferos.

Los estudios para determinar los factores de bioconcentración de productos químicos, en rotíferos son limitados. Los factores de bioconcentración sólo se han reportado con tres especies de rotíferos. Se calcularon bajo condiciones de laboratorio experimentales con *Brachionus calyciflorus* para el selenio (Dobbs et al., 1996) y los PCB (Joaquim-Justo et al., 1995), así como para los mono-, di-, y de tributilestaño con *Brachionus plicatilis* (Hong-Wen et al., 2001). Rubio (2009), reportó el primer caso de biomagnificación de plomo en algunos organismos acuáticos de niveles tróficos intermedios y/o superiores. En el rotífero *Asplanchna brighwellii* (depredador), con un FBC en condiciones de laboratorio de 490, lo que permite aseverar que en los primeros niveles tróficos se presenta bioacumulación y biomagnificación de este metal, que al igual que el Cromo es un metal pesado. La importancia de la obtención de FBC de metales en invertebrados acuáticos resulta ser indispensable al realizar análisis de la toxicidad de contaminantes al evaluar en cuerpos de agua, lagos, y mares.

Con nuestros valores de FBC y comparando con las concentraciones letales medias, logramos comprobar que el Cromo Hexavalente es más dañino para las dos especies de rotíferos, causando mortalidad a concentraciones muy bajas, sin embargo el Cromo trivalente también causa efectos adversos al oxidarse para cambiar su estado de valencia a la forma hexavalente.

6.3 Efecto del Cromo en la composición elemental de los rotíferos en un análisis de rayos X, por microscopía electrónica de barrido.

En el análisis de la composición elemental de estructuras externas de los rotíferos *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridentata* por medio de dispersión de rayos X en microscopía electrónica de barrido. Se detectan principalmente los siguientes elementos: carbono (C), oxígeno (O), calcio (Ca), silicio (Si) y cobre (Cu), en organismos control. En cambio, en los organismos expuestos de ambas especies al Cr III y al Cr VI hay la presencia de picos de Cr, Cu, Ca y O. Los resultados del porcentaje de peso atómico de los organismos intoxicados indican mayor porcentaje de Cromo trivalente (% peso $_{Cr III} = 5.073$ y % peso $_{Cr VI} = 2.254$) que de cromo hexavalente en *Lecane quadridentata*. Y aún menor de cromo trivalente en *Brachionus calyciflorus* (% peso $_{Cr III} = 0.706$). A diferencia de los organismos control, en los que el mayor porcentaje de peso atómico le corresponde al Carbono con 71.515%.

Así mismo, se observó la deformación de la lóriga de *Brachionus calyciflorus* debido a la exposición de Cr III y Cr VI. Pero menor porcentaje en peso de Cr III, esto se puede atribuir a que la lóriga de *Lecane quadridentata* es más dura que la de *Brachionus calyciflorus*, lo cual puede impedir el intercambio de iones. Kotikova *et al.*, 2001 indica que los movimientos característicos de filtración y desplazamiento de *Brachionus calyciflorus* son dirigidos por un sistema neuromuscular; músculos de tipo estriado en diferentes orientaciones longitudinales, circulares, y músculos viscerales. (Kotikova *et al.*, 2001). Los resultados de Alvarado- Flores (2010) señalan también de la morfología de *Brachionus calyciflorus*, que los músculos de faringe y mástax están conectados al tracto digestivo, formando un complejo muscular alrededor de todo el tracto digestivo para facilitar el movimiento de filtración, coadyuvando al movimiento ciliar evidente en todo el tracto digestivo hasta llegar al estómago, y muestra la unión del músculo trasversal a la lóriga, lo cual representa una gran superficie de intercambio de nutrientes y iones. Por esta razón se presenta en nuestros resultados se presenta mayor susceptibilidad de *Brachionus calyciflorus* a los dos

tipos de cromo, debida a la facilidad para filtrar nutrientes y considerando que el cromo hexavalentes presenta gran solubilidad en ambientes acuáticos y que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y puede ser transportado activamente al interior de las células (Borst-Pauwels, 1981).

Sin embargo, los rotíferos varían en su arreglo muscular y depende de su hábitat y adaptaciones evolutivas. Pérez-Legaspi (2009), compara la musculatura del rotífero *Lecane quadridentata* el cual es epibentónico, destacando la musculatura que posee dicho rotífero, es decir músculos retráctiles muy fuertes de la corona y el pie, los cuales probablemente son una especialización para desplazarse en un hábitat bentónico particularmente denso.

6.4 Respuestas bioquímicas a metalotioneínas.

El estudio de la expresión de metalotioneínas mostró que ambas especies las produjeron como una respuesta a la exposición a Cr III y VI. Sin embargo, las respuestas fueron diferentes en cuanto a las zonas de expresión y la magnitud de las mismas.

Las metalotioneínas son caracterizadas por sus grupos politioles y la afinidad a los metales, lo que les permite las funciones detoxificadoras de metales y xenobióticos, de homeostasis y antioxidantes de metales pesados (Karin, 1985).

Piscator (1964), señala que los metales de transición son los inductores más potentes de las MT-I y MT-II. Un ejemplo de ello fue la primera vez que se observaron cambios tisulares de estas proteínas tras la administración de cadmio (Cd) (Metal que forma parte de grupo B, al igual que el cromo).

El estudio de la expresión de metalotioneínas en *Brachionus calyciflorus*, en organismos intoxicados con Cr III, mostró que se destacan tres principales zonas de expresión: en la parte superior, la zona de la cabeza; en la parte media del máxtas-cerebro y en la parte inferior del microorganismo, la zona desde el

estómago hasta el vitelario. Los sitios específicos de la zona de la cabeza donde se observó inmunoreactividad serían: la corona de cilios (apr), antena (ant) y disco trocal (dtr). En parte media se muestra inmureactividad en el máxtas. Finalmente, también hubo reacción en la región de la cutícula.

El estudio de la expresión de metalotioneínas en *Lecane quadridentata* mostró que las principales zonas de expresión son: a) en la parte superior la zona de la cabeza, b) en la parte media, la zona del máxtas y cerebro, y c) en la parte inferior, el estómago y vitelario. La región del músculo de la corona es donde se observó reacción más específica en esta especie.

Las razones por las cuáles se puede atribuir la expresión de metalotioneínas en las dos especies de rotíferos, es por su función detoxificadora. Bremner and Beattie (1990); Maret *et al.*, (1993), señalan que puede ser un proceso secundario debido a la unión del Cd a las metalotioneínas, por su gran parecido con el Zinc (Zn). Se sabe que las metalotioneínas interactúan con el Zinc (Zn) y el Cobre (Cu), ya que estos pueden modular la expresión de MT- I Y MT- II, a través de cantidades presentes en la dieta (Richards and Cousins, 1976; Menard, *et al.*, 1981; Bremner et al., 1986) y otros metales ambientales.

Al igual que el Zn y el Cu, también el Cr es un metal fisiológico, por sus características se acepta que las metalotioneínas (MTs) participarían en la homeostasis con metales pesados. Aunque a elevadas concentraciones resultan ser tóxicos. El exceso de los metales puede juntarse con las MTs en forma de agregados insolubles en los lisosomas (Bremner, 1992; Chan and Cherian, 1993), y de esta manera las MTs, mantienen el rango fisiológico de los metales.

La magnitud de la expresión es mayor en *Brachionus calyciflorus* que en *Lecane quadridentata*. Esto puede explicarse debido a las cualidades de la lóriga de *Brachionus calyciflorus* que es más suave y le permite ser una membrana más permeable, lo cual puede aumentar las funciones detoxificadoras, de homeostasis e incluso antioxidantes, recordando que intermediarios reductores de cromo en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) funcionan como catalizadores de

reacciones tipo Fenton, generando Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), a las cuales podemos asignar el consecuente daño reflejado en la lóriga de *Brachionus calyciflorus* con el consecuente daño oxidativo, produciendo peroxidación de lípidos y considerando que la lóriga de este rotífero tiene bastante tejido adiposo. Por lo tanto las metalotioneínas se pueden intervenir como respuesta de emergencia al estrés oxidativo.

7. Conclusiones.

El presente trabajo representa la primera comparación de las dos identidades del cromo más comunes Cr III y Cr VI, en dos especies de rotíferos dulceacuícolas *Brachionus calyciflorus* y *Lecane quadridentata*, pertenecientes a la clase Monogononta. Comprobándose la mayor toxicidad del cromo en su forma hexavalente, arrojando en primer lugar, valores de CL₅₀, relativamente bajos, provocando efectos adversos como la mortalidad cuando se exponen los microorganismos a los tóxicos, afectando su movilidad y estructura externa.

Este estudio también contribuye con los primeros valores de FBC en rotíferos, comparando ambas especies con ambos tóxicos. Resultando ser más susceptible *Brachionus calyciflorus* que *Lecane quadridentata*, Sin embargo los análisis de rayos X, por microscopía electrónica de barrido, demuestran en la composición elemental, que además de los elementos principales como son Carbono (C), Oxígeno (O), Calcio (Ca), Silicio (Si) y Cobre (Cu), también está presente el Cromo III en *Brachionus calyciflorus* y Cromo III y VI en *Lecane cuadridentata*.

Lo cual nos indicó que el cromo puede bioacumularse e incluso biotransformarse para pasar de su estado trivalente a su estado hexavalente y biomagnificarse en las cadenas tróficas.

En comparación con otros invertebrados y peces, las dos especies de rotíferos son más sensibles. Analizando la susceptibilidad de los rotíferos, logramos observar la expresión de metalotioneínas afines a metales pesados como lo es el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Cromo, identificando las zonas en donde se mostraba inmunoreactividad. Llegando a la conclusión de que para evaluar los efectos tóxicos de los contaminantes químicos es importante elegir adecuadamente el organismo de prueba, compararlo con una especie semejante, pues no sólo es necesario contar con un valor de CL_{50} , sino que es también indispensable el poder inferir posibles daños sobre las comunidades acuáticas en los sistemas receptores a partir de los resultados, ya que nos permite seguir investigando y proponer alternativas de solución a la problemática. Hacer énfasis en que los metales pesados, principalmente los de potencial uso como lo es el cromo, de acuerdo al incremento de las industrias automotrices, son peligrosos porque tienden a bioacumularse lo que significa un aumento en la concentración de un producto químico en un organismo biológico en cierto plazo, los cuales pueden entrar al recurso hídrico por medio de los desechos industriales.

Si bien es cierto que el Cromo III es un oligoelemento esencial para los seres vivos, también es cierto que puede biotransformarse en combinación con otros elementos y persistir como contaminante.

Es importante mencionar que las sustancias potencialmente tóxicas también pueden encontrarse en concentraciones tan bajas como las presentadas en este estudio, o en condiciones ambientales en las cadenas tróficas, que no se podrían detectar con los métodos convencionales, de aquí la necesidad de los bioensayos, ya que además de detectar concentraciones mínimas de un contaminante, también son un método rápido, económico y confiable.

Glosario.

Bioacumulación: Acumulación neta, con el paso del tiempo, de metales (u otras sustancias persistentes) en un organismo a partir de fuentes tanto bióticas (otros organismos) como abióticas (suelo, aire y agua).

Biomagnificación: Tendencia de algunos productos químicos a acumularse a lo largo de la cadena trófica, exhibiendo concentraciones sucesivamente mayores al ascender el nivel trófico. La concentración del producto en el organismo consumido es mayor que la concentración del mismo producto en el organismo consumido.

Cadena trófica: Serie o conjunto de organismos, cada uno de los cuales come o degrada al precedente. Representa la dependencia alimenticia de unos organismos hacia otros en cualquier comunidad natural. Rara vez hay más de seis eslabones en la cadena.

Concentración: La cantidad de un producto o de una sustancia química presente en una cantidad dada en suelo, agua, aire, alimento, sangre, cabello, orina, aliento o cualquier otro medio. La concentración se expresa frecuentemente en miligramos por metro cúbico (mg/m³), partes por millón (ppm), partes por mil millones (ppb, del inglés —parts per billion) o en porcentaje (%).

Contaminación: Cualquier sustancia que por su concentración posee efectos negativos sobre el entorno, o bien la introducción de una sustancia o forma de energía que puede provocar algún daño o desequilibrio, irreversible o no, en el medio inicial.

Exposición aguda: Contacto con una sustancia que ocurre una sola vez o durante un período de tiempo corto.

Rotífero: Rotífero, del latín *rota*, “rueda” y *fera*, “los que llevan”, constituyen un filo de animales pseudocelomados microscópicos (entre 0.1 y 2 mm) con unas 1,800

especies que habitan en aguas dulces, tierra húmeda, musgos, líquenes, hongos e incluso agua salada.

Toxicidad: La capacidad o la propiedad de una sustancia de causar efectos adversos sobre la salud. Una dosis tóxica es una cantidad determinada de una sustancia que podría esperarse que, en condiciones específicas, ocasionara daños a un organismo vivo.

Tóxico: Sustancia tóxica que puede causar efectos adversos en los organismos expuestos, como resultado de interacciones fisicoquímicas con sus tejidos.

Zooplankton: Se denomina zooplankton a la fracción del plancton constituida por seres que se alimentan de materia orgánica ya elaborada por ingestión. Está constituido por protozoos, es decir, protistas diversos, fagótrofos que engloban el alimento fagocitándolo. También por larvas de animales más grandes, como esponja, gusanos, equinodermos, moluscos o crustáceos, y de otros artrópodos acuáticos, así como formas adultas de pequeño tamaño de crustáceos como copépodos o cladóceros, rotíferos, y fases juveniles de peces (alevines).

Bibliografía

- Anderson, R. A., 1989. Essentiality of chromium in humans. *Sci Total Environ* 86(1-2):75-81.
- Albert, L.A. 1997. Cromo. *In*: Albert, L.A. (Ed.). Introducción a la toxicología ambiental. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OPS, OMS, LIMUSA, Gob. Edo. De México, Secretaría de Ecología, México: 227-246.
- Alvarado-Flores, J., 2010. Efecto de la bioacumulación de plomo sobre la tasa intrínseca de crecimiento (r) y otros parámetros poblacionales, localización celular de plomo y determinación de factores de bioconcentración en una especie de rotífero dulceacuícola. Tesis maestría. Centro de ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. 85pp.
- APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th edn. Washington, DC.
- Borst-Pauwels, G. W. F. H. 1981. Ion transport in yeast. *Biochim Biophys Acta* 650(2-3):88-127.
- Bremner I. (1992). Quantification of metallothionein isoforms using and enzymelinked inmunosorbet assay (ELISA) with two specific antisera. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 116: 267- 270.
- Bremner, I., Beattie, J. H. (1990). Metallothionein and the trace minerals. *Ann. Rev. Nutr.*, 10: 68–83.
- Bremner, I., Mehra, R. K., Morrison, J. N. & Wood, A. M (1986) Effects of dietary copper supplementation of rats on the occurrence of metallothionein-

I in liver and its secretion into blood, bile and urine. *Biochem. J.* 235: 735-739.

- Bryan, G. W., M. Waldichuk., R.J. Penteach., and A. Darracott. 1979. Bioaccumulation of marine pollutants (and Discussion). *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 286: 483-505.
- Calder, L.M., 1988. "Chromium Contamination of Groundwater" In: *Chromium in the Natural and Human Environments*. Vol. 20 (J.O. Nriagu and E. Nieboer, editors). John Wiley & Sons, New York: 215 through 230.
- Chan, H.M. and Cherian M.G. (1993a). Ontogenic changes in hepatic metallothionein isoforms in prenatal and newborn rats. *Biochem. Cell. Biol.* 71: 133-140.
- De Forest, D. K., K. V. Brix and Adams W. J. 2007. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicology*. 84: 236-246.
- Dobbs MG, Cherry DS, Cairns J Jr (1996) Toxicity and bioaccumulation of selenium to a threetrophic level food chain. *Environ Toxicol Chem* 15:340–347.
- Dorn P.B., Rodgers Jr. J.H., Kop K.M., Raia J.C. y Dickson K.L. (1987). Hexavalent chromium as a reference toxicant in effluent toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 435-444.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N. 2001. Toxic metals and oxidative stress Part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 1(6):529-539.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Flores-Tena, F.J. 2000. Toxicidad de los sedimentos de la Presa El Niágara (Aguascalientes, aplicando *Limnodrilus hoffmeisteri* como sistema de prueba). Tesis Doctoral. Fac. de Ciencias U.N.A.M. México. 92 pp.
 - Hong-Wen S, Shu-Gui D, Guo-Lan H (2001) Bioaccumulation of butyltins via an estuarine food chain. *Water Air Soil Pollut* 125:5–68.
 - Irwin R. J., M. VanMouwerik, L. Stevens, M. D. Seese & W. Basham (1998). *Environmental Contaminants* Enciclopedia. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. Distributed on the internet via the Nature Net portion, of the Park Service Home page (www.nps.gov).
 - Joaquim-Justo C, Gosselain V, Descy JP et al (1995). Relative importance of the trophic and direct pathways on PCB contamination in the rotifer species *Brachionus calyciflorus* (Pallas). *Hydrobiologia* 313(314): 249–257.
 - Karin, M. (1985). Metallothioneins: proteins in search of function. *Cell* 41: 9-10.
 - Katz, S.A., Salem, H. 1993. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *J Appl Toxicol* 13(3):217-224.
 - Kefford BJ, Papas PJ, Nuggeoda D (2003) Relative salinity tolerance of macroinvertebrates from the Barwon River, Victoria, Australia. *Mar Freshw Res* 54:755–765
 - Khale, J. and Zauke G.-P. 2002. Bioaccumulation of trace metals in the copepod *Calanoides acutus* from the Weddell Sea (Antarctica): comparison of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models. *Aquatic Toxicology*. 59: 115-135.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Kotikova, E.A., Raikova, O.I., Flyatchinskaya, L.P., Reuter, M., y M.K.S. Gustafsson. 2001. Rotifer muscles as revealed by phalloidin-TRITC staining and confocal scanning laser microscopy. *Acta Zoologica*. 82: 1-9.
 - Landis, W. G & Yu M. (2003). *Introduction to environmental toxicology: Impacts of chemicals upon ecological systems* (3a Ed.). Florida: Lewis Publishers.
 - Liu, K., Shi, X. 2001. In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Mol Cell Biochem* 222(1-2):41-47.
 - Losi, M. E., Amrhein, C., Frankenberger, W. T. J. 1994. Environmental biochemistry of chromium. *Rev Environ Contam Toxicol* 136:91-131.
 - Nichols, H. W. 1973. Growth media-freshwater. In J. R. Stein (ed.), *Handbook of physiological methods* II. Cambridge University Press. 7-24.
 - Nriagu, J. 1990, Global metal pollution poisoning the biosphere. *Environment* 32(7): 7-32.
 - Nogrady, T., R. L., y T. W. Snell. 1993. Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world 4: Rotifera. Volume 1: Biology, Ecology and Systematics. SPB Academic Publishing. Holanda. 39-44.
 - Maret, W.; Larsen, K.S.; Vallee, B.L. Coordination dynamics of biological zinc "clusters" in metallothioneins and in the DNA-binding domain of the transcription factor Gal4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 2233–2237.
 - Martínez-Jerónimo, F., Rodríguez-Estrada, J., Martínez-Jerónimo, L., 2008. *Daphnia exilis* Henrick, 1895 (Crustácea Cladóceras). Una especie zooplanctónica potencialmente utilizable como organismo de prueba en bioensayos de toxicidad aguda en ambientes tropicales y subtropicales. *Contam. Ambient.* 24 (4) 153-159.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Mejía J.J., F. Díaz-Barriga, J. Calderón, C. Ríos, y Jiménez-Capdeville M.E. 1997. Effects of lead-arsenic combined exposure on central monoaminergic systems. *Neurotoxicol Teratol.* 9:489-497.
 - Menard, M. P., McCormick, C. C. & Cousins, R. J. (1981) Regulation of intestinal metallothionein biosynthesis in rats by dietary zinc. *J. Nutr.* 111: 1353–1361.
 - Miller, D.M., Buettner, G.R. y Aust, S.D., 1990. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 8, pp. 95-108.
 - Munn SJ, Allanou R, Aschberger K, Berthault F, Cosgrove O, Luotamo M, Pakalin S, Paya-Pérez A, Pellegrini G, Schwarz-Schulz B, Vegro S (2005) Chromium trioxide; sodium chromate, sodium dichromate, ammonium dichromate, potassium dichromate, EUR 21508EN. European Union Risk Assessment Report, Volume 53. Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities.
 - Ojeda-Gómez, J. 2008. Medición de los niveles de contaminación por el metal cromo en homogeneizados de muestras zooplanctónicas de la presa “El Niágara”. Tesis maestría. Centro de ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. 52pp.
 - Palmer, C.D. and P.R. Wittbrodt. (1991). “Processes Affecting the Remediation of Chromium-Contaminated sites.” *Environmental Health Perspectives*. Vol. 92. Pages 25 through 40.
 - Paquin, PR., Farley K, Santore RC, Kavvadas CD, Mooney KG, Winfield RP, Wu K-B, Di Toro DM. 2003. Metals in aquatic systems: A review of exposure, bioaccumulation, and toxicity models. Pensacola, Florida: SETAC Press. 140 p.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Pawlisz, A.V., R. A. Kent., U.A. Schneider & C. Jefferson. 1997 *Canadian water quality guidelines for the chromium*. Environ Toxicol. Water Quality 12: 185-193.
 - Pérez Legaspi, I.A. 2000. *Desarrollo de pruebas de toxicidad agudas y subcrónicas utilizando tres especies de rotíferos dulceacuícolas del género (Lecane Rotífera, Monogononta)*. Tesis maestría. Centro de ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. 79pp.
 - Pérez-Legaspi IA, Rico-Martínez R (2001). Acute toxicity tests on three species of the genus Lecane (Rotifera: Monogononta). *Hydrobiologia* 446(447):375–381
 - Pérez- Legaspi, I. A., y R. Rico-Martínez. 1998. Effect of temperature and food concentration in two species of littoral rotifers. *Hydrobiologia*. 387/388: 341-348.
 - Pérez-Legaspi, I.A., 2009. Estudio de los efectos de dos pesticidas en el sistema colinérgico en especies selectas de rotíferos dulceacuícolas. Aguascalientes, México. Tesis. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México.
 - Persaud, D.R. Jaagumagi & A. Hayton. 1992. *Guidelines for the protection and management of aquatic sediment in Ontario*. ISBN 0- 7729-9248- 7. Ontario Ministry of the Environment, Water Resources Branch, Toronto.
 - Piscator, M. (1964) Nord. Hyg. Tidskr. 45: 76-82.
 - Rand, G. & S. Petrocelli. 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere Corporation, Washington, D.C. 665 p.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Richards M.P. and Cousins, R.J. (1976) *J. Nutr.* 106, 1591-1599.
 - Ricci, C. y Balsamo M. 2000. The biology and ecology of lotic rotifers and gastrotrichs. *Freshwater Biology*. 44: 15-28.
 - Rico-Martínez, R., C. A. Velazquez, I.A. Pérez & G.E. Santos. 2000. *The use aquatic invertebrate toxicity tests and invertebrate enzyme biomarkers to assess toxicity in the states of Aguascalientes, and Jalisco, Mexico.* In. Butterworth *et al.* (Eds). *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2*. Kluwer Academic Plenum Publishers, New York. Pp. 127-137.
 - Rubio, IF. 2009. Estudio de los niveles de plomo en la presa el Niágara y su probable biomagnificación. Aguascalientes, México. Tesis. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México.
 - Shanker AK., Cervantes C. Loza-Tavera H., Avudainayagam S. (2005) Chromium toxicity in plants. *Environment International* 31:739-753.
 - SEMARNAP, PROFEPA. 1995. *Mortandad de aves acuáticas en la Presa de Silva, Gto.* Informe Técnico. 167pp.
 - Schumacher, M., J J Domingo, J. M. Lobert & J. Corbella 1995. *Variations on heavy metals in wáter, sediments, and biota from the delta of Ebro river, Spain.* *J. Environ. Sci. Health A30* (6): 1361-1372.
 - Smith, S.L., D.D. Mc Donald, K.A. Keenleyside, C.G. Ingersoll & L. Jay. 1996. *A preliminary evaluation of sediment quality assessment values for freshwater ecosystems.* *J. Great Lakes Res.* 22(3): 624-638.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Sumner, E.R., Shanmuganathan, A., Sideri, T.C., Willetts, S.A., Houghton, E.J., Avery, S. 2005. Oxidative protein damage causes chromium toxicity in yeast. *Microbiol* 151(Pt 6): 1939-1948.
 - Stoecker, B., 2004. Chromium. In: Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoepler M (Eds.), *Elements and their Compounds in the Environment*, 2nd ed. Vol 2. Metals and their compounds. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 709–729.
 - Valko, M., Morris, H., y Cronin, M.T.D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12, pp. 1161-1208.
 - Velandia- Guauque, L., Montañez-Cardoso, Y., 2010. Determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₄₈) del plomo y cromo hexavalente mediante ensayos de toxicidad acuática, utilizando *Daphnia pulex*. Bogotá, D.C. Tesis. Licenciatura en Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Facultad de Ingeniería, Universidad La Salle, Bogotá, D.C.
 - Vera- Candiotti, J., Soloneski S., Larramendy M.L., 2011. Acute Toxicity of chromium *Cnesterodon desemmaulatus* (Pisces: Poeciliidae). *Theoria*, Vol. 20 (1): 81-88, 2011.
 - Wiederholm, T. & G. Dave 1989. *Toxicity and metal polluted sediments to Daphnia magna and Tubifex tubifex*, *Hydrobiology*, 176/177: 411-417.
 - Wong, P.T., Trevors, J.T. 1988. Chromium toxicity to algae and bacteria. In: Nriagu, J.O., Nieboer, E. Eds. *Chromium in the Natural and Human Environments*. Wiley, New York, pp 305-315.

Anexos

Anexo A

Preparación del medio basal de Bold (Nichols, 1973) para *Nannochloris Oculata* (Cepa LB2194 de la colección de la universidad de Texas)

Consiste en preparar en un litro de agua destilada se agregará los siguientes micro nutrientes: 250 mg de NaNO_3 , 25 mg de $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$, 75 mg de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 75 mg de KHPO_4 , 175 mg de KH_2PO_4 , 25 mg de NaCl , éstos se agitarán en un matraz colocado en un agitador magnético, durante 11 Horas. Se esterilizarán y se agregará 2 mL de vitaminas (Tiamina, Biotina y Vitamina B12) y 2 mL de trazas ($\text{NaMoO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$, NaFe EDTA , $\text{MnCl} - 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 - 5\text{H}_2\text{O}$ y $\text{ZnSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$).

Preparación de Medio EPA, según U.S Environmental Protection Agency (1985).

Este medio se preparará en un litro de agua desionizada se agregarán 96 mg de NaHCO_3 , 60 mg de $\text{CaSO}_4\text{H}_2\text{O}$, 60 mg de $\text{MgSO}_4\text{H}_2\text{O}$ y 4 mg de KCl , éstos en un matraz colocando un agitador magnético para su disolución, después se ajustar el pH a 7.5 con HCl ó KOH .

Anexo B

Relación de muestras y Stocks.

CL₅₀ Cr VI (24hrs)

B.C Gainesville = $4 \cdot 10^{-6}$ mg/L Stock 0.00001 mg/L

B.C. Sn Pancho = $4 \cdot 10^{-6}$ mg/L Stock 0.00001 mg/L

Lecane Q= $4.7 \cdot 10^{-5}$ mg/L Stock 0.0001mg/L

CL₅₀ Cr III (24hrs)

B.C Gainesville = 1.051mg/L stock 10mg/L

B.C. Sn Pancho = 0.64mg/L stock 10mg/L

Lecane Q= 1.279 mg/L stock 10mg/L

Pruebas para Absorción atómica (AA).

1, 2, 3: Cumbres: Agua de Cumbres (1ml) + 500µl de HNO₃

Cr III

Lecane Q.

4, 5, 6: EPA (1ml) + 500µl de HNO₃

7, 8, 9: EPA + Tóxico CL₅₀ (1ml) + 500µl de HNO₃

10, 11, 12: Sólo Rotíferos de los intoxicados (sólo Pastilla) + 500µl de HNO₃

13, 14, 15: CL₅₀ sin rotíferos (1ml) + 500µl de HNO₃

B.C Gainesville

16, 17, 18: EPA (1ml) + 500µl de HNO₃

19, 20, 21: EPA + Tóxico CL₅₀ (1ml) + 500µl de HNO₃

22, 23, 24: Sólo Rotíferos de los Intoxicados (sólo pastilla) + 500µl de HNO₃

25, 26, 27: CL₅₀ sin rotíferos (1ml) + 500µl de HNO₃

Cr VI

B.C Gainesville

28, 29, 30: EPA (1ml) + 500µl de HNO₃

31, 32, 33: EPA + Tóxico CL₅₀ (1ml) + 500µl de HNO₃

34, 35, 36: Sólo Rotíferos de los intoxicados (sólo pastilla) + 500µl de HNO₃

37, 38, 39: CL₅₀ sin rotíferos (1ml) + 500µl de HNO₃

Controles

Lecane Q.

40, 41, 42: Rotíferos en 1ml de EPA + 500µl de HNO₃

B.C Gainesville.

43, 44, 45: Rotíferos en 1ml de EPA + 500µl de HNO₃

46, 47, 48: Rotíferos de Cumbres en 1ml de EPA + 500µl de HNO₃

Lecane Q. Cr VI.

49, 50, 51: Sólo Rotíferos de los intoxicados (sólo pastilla) + 500µl de HNO₃

52, 53, 54: CL₅₀ sin rotíferos (1ml) + 500µl de HNO₃

55, 56, 57: Control Pastilla Rotíferos en 1 ml EPA+ 500µl de HNO₃

58.59, 60: EPA (1ml) + 500µl de HNO₃

61, 62, 63: EPA + Tóxico CL₅₀ (1ml) + 500µl de HNO₃

B.C. S. P. Cr III

64, 65, 66: Sólo Rotíferos de los intoxicados (sólo pastilla) + 500µl de HNO₃

67, 68, 69: CL₅₀ sin rotíferos (1ml) + 500µl de HNO₃

70,71, 72: Control Pastilla Rotíferos en 1 ml EPA+ 500µl de HNO₃

73, 74, 75: EPA (1ml) + 500µl de HNO₃

76, 77,78: EPA + Tóxico CL₅₀ (1ml) + 500µl de HNO₃

B.C. S. P. Cr VI.

79, 80, 81: Sólo Rotíferos de los intoxicados (sólo pastilla) + 500µl de HNO₃

82,83, 84: CL₅₀ sin rotíferos (1ml) + 500µl de HNO₃

85,86, 87: Control Pastilla Rotíferos en 1 ml EPA+ 500µl de HNO₃

88, 89, 90: EPA (1ml) + 500µl de HNO₃

91, 92, 93: EPA + Tóxico CL₅₀ (1ml) + 500µl de HNO₃

Anexo C

Relación de Muestras para Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) y composición elemental de cromo en los microorganismos.

Lecane Quadridentata

M1: Control

M2: CL50 Cr III

M3: Límite Superior Cr VI

M4: Límite Inferior Cr III

M5: CL50 Cr VI

M6: Límite Inferior Cr VI

M7: Límite Superior Cr III

B. C. Gainesville

M8: CL50 Cr III

M9: Límite Inferior Cr III

M10: Límite Superior Cr III

M11: CL50 Cr VI

M12: Límite Inferior Cr VI

Composición elemental Control (M1). Límite inferior (M4) para *Lecane quadridentata*

ELEMENTOS	Rotíferos M-1						Rotíferos M-4					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Carbono (C)	72.93	71.08	70.91	71.14			63.25	70.34	71.41	64.5	69.55	68.35
Oxígeno (O)	13.87	20.77	26.52	27.19			12.1	28.16	26.09	20.09	28.46	29.9
Calcio (Ca)	0.21		2.58	0.19			1.17	1.51		0.72		
Cobre (Cu)		0.77		1.16			1.49		0.98	0.52	0.51	1.34
Silicio (Si)				0.33			0.98		0.42	0.2		
Cromo (Cr)							2.99		1.1	0.46	0.49	0.42
Niobio (Nb)	12.99	7.38					10.54			8.07		
Platino (Pt)							7.49			5.45		

Composición elemental de Cromo III Límite Inferior (M9), para *B.C. Gainesville* y Cromo III CL₅₀ (M2), para *Lecane quadridentata*.

ELEMENTOS	Rotíferos M-9						Rotíferos M-2					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Carbono (C)	63.14	70.54	73.53	67.96	74.55	73.2	69.11	66.46	63.25	68.93	54.54	62.82
Oxígeno (O)	25.12	25.7	25.52	29.91	21.79	26.67	20.58	20.58	18.69	30.15	25.73	17.51
Calcio (Ca)	5.45	1.13		0.73			0.39	0.67	2.93		2.18	0.96
Fosforo (P)	0.05										0.11	
Cobre (Cu)		2.64	0.96	1.31	3.63		0.86	1.02	0.59	0.81	1.31	0.98
Silicio (Si)								0.3				
Cromo (Cr)				0.11	0.03	0.13	0.42	5.26	3.23	0.11	15.44	5.98
Aluminio (Al)								0.28	0.29		0.69	0.28
Fierro (Fe)									0.45			
Niobio (Nb)									5.4			6.59
Iridio (Ir)									1.33			
Platino (Pt)	6.24								0.29			4.88

Composición elemental de Cromo VI límite superior (M3), límite inferior (M6), para *Lecane quadridentata*.

ELEMENTOS	Rotíferos M-3						Rotíferos M-6					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Carbono (C)	69.37	72.16	70.1	72.39	68.71	75.12	73.06	61.57	66.54	69.17	67.52	68.77
Oxígeno (O)	30.22	26.83	16.94	25.85	19.02	22.64	15.71	33.57	19.98	19.43	26.59	21.16
Calcio (Ca)	0.26		0.61	0.36			0.3	74	0.34	0.28	0.89	
Cobre (Cu)		0.99	1.46	1.24	0.58	1.78	0.61	1.31	0.41	0.61	0.99	0.4
Silicio (Si)								0.76		0.38	1.12	0.33
Cromo (Cr)	0.04	0.01		0.17	0.45	0.46	0.05	1.98	0.4	0.2	0.74	1
Niobio (Nb)			1090		7.13		5.76		7.13	6.04		4.96
Rubidio (Rb)									0.6			
Platino (Pt)					4.11				4.6	3.91	2.14	3.38

Composición elemental de Cromo VI CL50 (M5), para *Lecane quadridentata* y Cromo III CL₅₀ (M8), para *B.C. Gainesville*.

ELEMENTOS	Rotíferos M-5						Rotíferos M-8					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Carbono (C)	69.46	67.16	64.14	67.24	67.5	66.51	63.54	69.7	68.82	69.02	66.23	62.22
Oxígeno (O)	28.64	21.02	17.03	31.81	31.62	22.32	32.87	28.05	29.65	27.31	31.65	35.75
Calcio (Ca)		0.43	0.81		0.65	0.77					0.59	0.74
Cobre (Cu)	1.07		0.97	0.57	0.22	1.37	2.53	2.24	1.52	3.42	1.43	1.16
Cromo (Cr)	0.83	0.11	5.09	0.39		5.85	1.07		0.02	0.25	0.008	0.13
Aluminio (Al)						0.53						
Niobio (Nb)		6.77	6.99									
Platino (Pt)		4.51	4.96			2.24						

Composición elemental de Cromo VI CL50 (M11), para *B.C. Gainesville* y límite superior Cromo III (M7), para *Lecane quadridentata*.

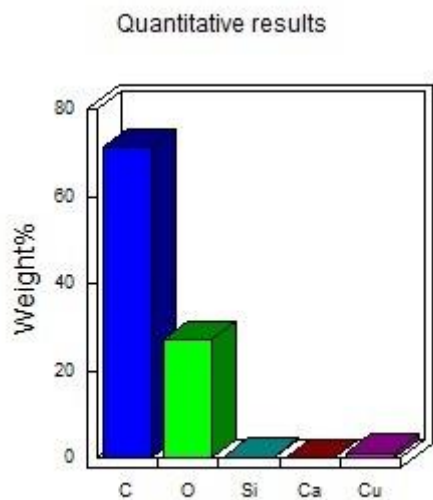
ELEMENTOS	Rotíferos M-11						Rotíferos M-7					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Carbono (C)	65.94	61.7	63.09	63.48	63.53	62.31	68.7	70.34	65.46	80.16	65.29	65.73
Oxígeno (O)	32.2	35.26	35.79	20.39	34.94	26.4	30.56	28.13	32.2	18.17	32.77	32.89
Calcio (Ca)	0.55	0.98	0.4	0.7	0.55				0.54		0.38	1.31
Cromo (Cr)	0.11	0.19	0.01		0.08	0.05	0.007		0.21	0.11	0.43	0.007
Cobre (Cu)	1.2	1.87	0.71	0.81	0.9	5.32	0.68	1.54	1.25	1.56	1.13	
Niobio (Nb)				9.13								
Platino (Pt)				0.42								

Composición elemental de Cromo III, límite superior (M10), y límite inferior Cromo VI (M12), para *B.C. Gainesville*.

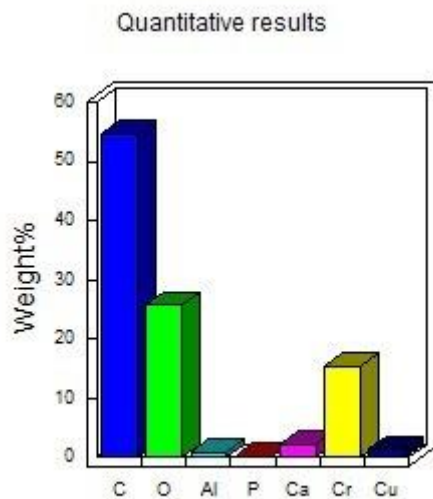
ELEMENTOS	Rotíferos M-10						Rotíferos M-12					
	1	7	3	4	5	6	1	2	7	4	5	6
Carbono (C)	64.38	63.48	65.97	65.07	62.15	68.01	66.04	60.54	65.02	65.13	63.76	64.5
Oxígeno (O)	31.47	33.61	31.38	32.97	32.26	30.75	32.6	20.86	30.95	33.96	34.51	33.11
Calcio (Ca)	0.81	0.59	0.49	0.44	0.77			0.54	1.25	0.78	0.37	1.14
Cobre (Cu)	2.85	1.61	1.52	1.34	2.79	1.05	1.25	11.51	2.47		1.26	1.25
Cromo (Cr)	0.49	0.71	0.65	0.17	2.03	0.19	0.1	0.06	0.32	0.13	0.11	
Platino (Pt)								6.5				

- Nota:** - Los valores del % Peso (Weight %) menores de 0.1 no son confiables.
 - Los valores de los elementos se dan en % Peso atómico (Weight %).
 - Cuando la muestra no está completamente plana su porcentaje de error varía entre el 3 y 5%.
 - Todas las muestras cubiertas con oro no tienen valor por lo tanto su % de peso es nulo.
 - El valor del oro se anuló de la gráfica espectral para obtener la cantidad real de cada uno de los elementos.

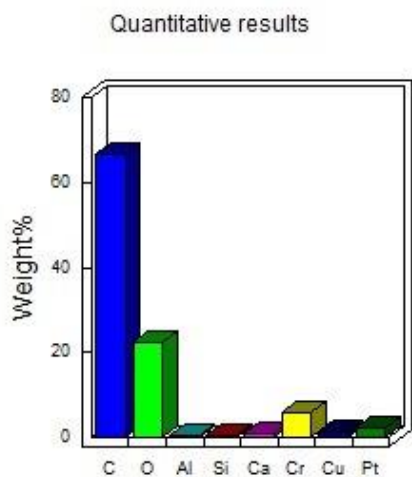
Composición elemental (Control) para *Lecane quadridentata*.



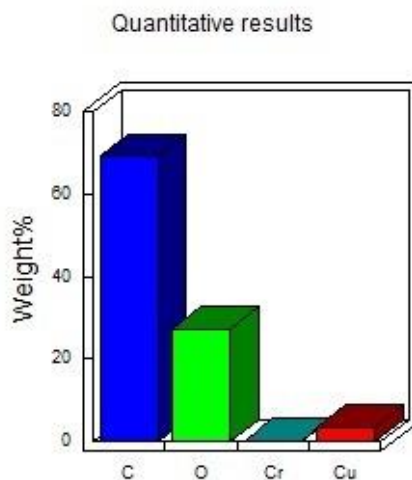
Composición elemental Cr III [CL₅₀] para *Lecane quadridentata*



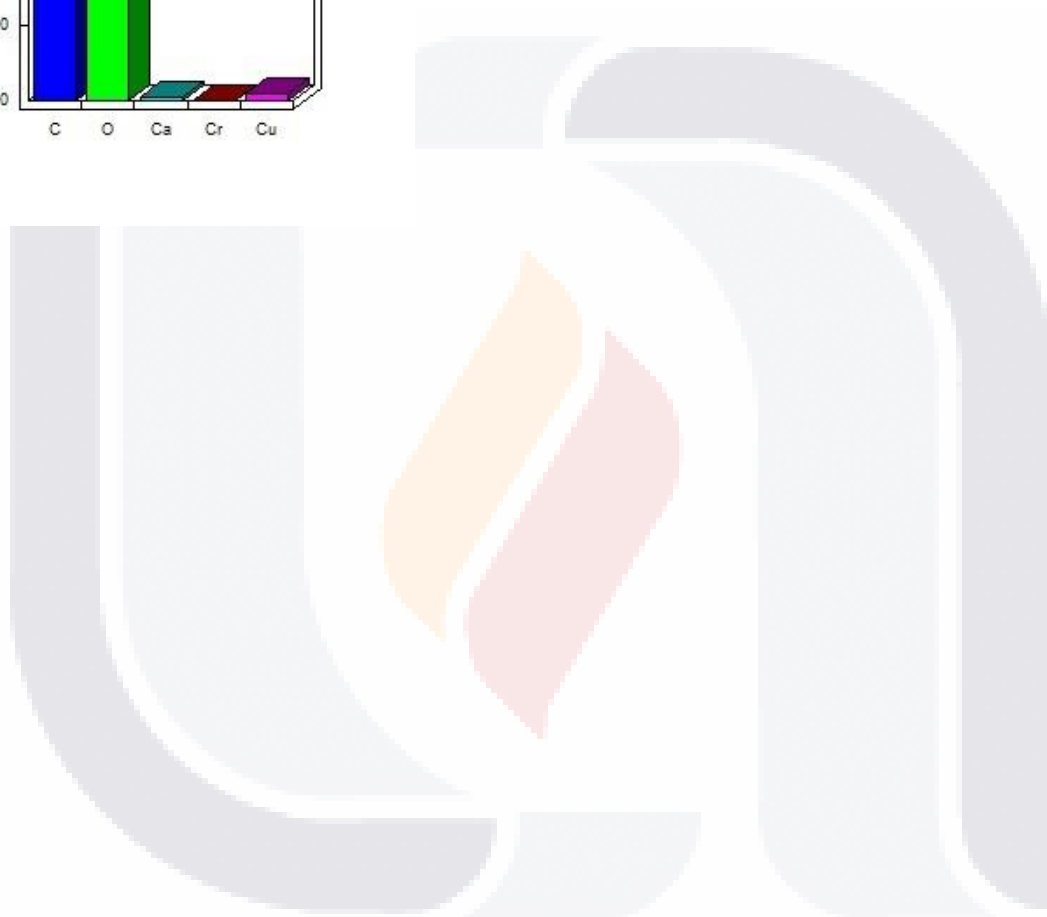
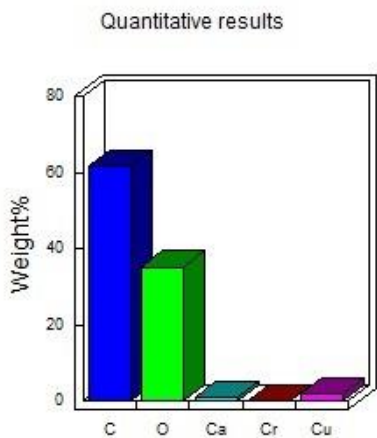
Composición elemental Cr VI [CL₅₀] para *Lecane quadridentata*.



Composición elemental Cr III [CL₅₀] para *B.C. Gainesville*.



Composición elemental Cr VI [CL₅₀] para *B.C. Gainesville*.



Anexo D

Media de Factores de Bioconcentración para cada tóxico y cada especie.

Factor de Bioconcentración para réplicas de <i>Lecane</i> con Cr III	
605.985102 649.159285 454.553265	Media= 569.899217
Factor de Bioconcentración para réplicas de <i>B.C. Gainesville</i> con Cr III	
694.628873 620.28837 585.31383	Media= 633.410357
Factor de Bioconcentración para réplicas de <i>B.C. Gainesville</i> con Cr VI	
3304945.05 1965247.25 1178571.43	Media= 2149587.91
Factor de Bioconcentración para réplicas de <i>Lecane</i> con Cr VI	
390694.412 672200.14 96563.0115	Media= 386485.855
Factor de Bioconcentración para réplicas de <i>B.C. San Pancho</i> con Cr III	
737.980769 660.885989 574.175824	Media= 657.680861
Factor de Bioconcentración para réplicas de <i>B.C. San Pancho</i> con Cr VI	
5796703.3 4348901.1 4307692.31	Media= 4817765.57