



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

"Efectos combinados del alga (*Chlorella vulgaris*) y  
dos metales pesados (plomo y cadmio) en el  
crecimiento poblacional del rotífero *Anuraeopsis*  
*fissa* (Gosse, 1851) (Rotifera: Brachionidae)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

**GERARDO CERÓN MARTÍNEZ**



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. S.S.S. SARMA

LOS REYES IZTACALA, MÉXICO

ABRIL, 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

- A mis padres: **Yolanda** y **Gerardo**, por apoyarme en todos los momentos de mi vida, en mis buenas y no tan buenas decisiones. Gracias por el cariño incondicional.
- A mis hermanas: **Sonia** y **María**, gran parte de esto se los debo a ellas, mas que por el apoyo económico, por el apoyo moral y aunque no se los diga muy seguido, las...
- A **Karina** T. B., te dedico este trabajo, porque tu fuiste y eres la primer y mejor amiga que tuve y que tengo; además porque me ayudaste en esto.
- A **Simona**, al **Tortus** y al **Greimy**.



## **AGRADECIMIENTOS**

- A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por darme la oportunidad de conocer la gran belleza y riqueza natural y cultural de México.
- A la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala**.
- Al Dr. **S. S. S. Sarma**, por aceptarme y dirigir este trabajo.
- A la Dra. **Nandini Sarma**, gracias por el apoyo y el cariño desde el principio.
- Al M. en C. **Jose Luis Gama Flores**, por las platicas, los bailes y por tu valioso apoyo.
- A la Bióloga **Teresa Ramírez Pérez**, por tus valiosos comentarios, que sirvieron para mejorar este trabajo.
- Al Dr. **Sergio Chazaro Olvera**, por tus enriquecedores puntos de vista.
- A **Yolanda, Gerardo, Sonia y Lupe**; gracias por la buena vida familiar.
- A **Karina Tavera Briseño**, gracias por compartir todo este tiempo de estudios, de practicas, de platicas... de todo conmigo.
- A los cuates en orden alfabético, para no comprometerme **Diego, Juan Carlos, Jonás, Karina, Mario, Nacho, Rafael, Renata, Sandra, Sara**, por todo el tiempo que nos toco compartir.
- A los cuates del museo: **Abigail, Judith, Martín**.
- A los integrantes del Laboratorio de Zoología Acuática; a los actuales: Karina, Rafa, Diego, Elisa, Alejandro Federico, Fabiola P., Gerardo y a los de antes: Mariana, Sara, Fabiola N., Hugo.
- A las "Marus", Maestras: **Maria Eugenia, Irma y Laura**; les agradezco tantos buenos momentos, las platicas, la enseñanza, la confianza, los consejos, el apoyo y el cariño.
- El apoyo económico durante la realización de este trabajo. PAPIIT, No. IN204101.
- **Soy orgullosamente UNAM.**

## ÍNDICE.

<b>Resumen</b> .....	1
<b>1. Introducción</b> .....	2
<b>2. Antecedentes</b> .....	9
<b>3. Justificación</b> .....	12
<b>4. Hipótesis</b> .....	14
<b>5. Objetivos</b> .....	14
❖ 5.1. Objetivo general.....	14
❖ 5.2. Objetivos particulares.....	14
<b>6. Materiales y Método</b> .....	15
❖ 6.1. Microalga.....	15
❖ 6.2. Rotífero.....	15
❖ 6.3. Concentración letal media (CL <sub>50</sub> ) (fase de toxicidad aguda).....	16
❖ 6.4. Crecimiento poblacional (fase de toxicidad crónica).....	16
<b>7. Resultados</b> .....	19
❖ 7.1. LC <sub>50</sub> .....	19
❖ 7.2. Crecimiento poblacional bajo el efecto del plomo.....	20
❖ 7.3. Día de abundancia máxima (Pb).....	21
❖ 7.4. Densidad máxima (Pb).....	25
❖ 7.5. Tasa de crecimiento poblacional (Pb).....	25
❖ 7.6. Crecimiento poblacional bajo el efecto del cadmio.....	26
❖ 7.7. Día de abundancia máxima (Cd).....	31
❖ 7.8. Densidad máxima (Cd).....	35
❖ 7.9. Tasa de crecimiento poblacional (Cd).....	35
<b>8. Discusión</b> .....	40
<b>9. Conclusiones</b> .....	46
<b>10. Referencias</b> .....	47
<b>11. Anexos</b> .....	53
❖ Anexo 1. Medios de cultivo.....	53
❖ Anexo 2. Método Probit.....	54
❖ Anexo 3. Tabla de r.....	55
❖ Anexo 4. Prueba de Tukey.....	56

## RESUMEN.

La contaminación ambiental ocasiona daños a los seres vivos y contribuye así a la pérdida de la biodiversidad. Los sistemas dulceacuícolas, son quizá donde se hace más notorio el deterioro ambiental. La contaminación del agua se puede definir como cualquier cambio que pueda afectar su uso posterior, dicho cambio puede ser causado por la introducción de sustancias orgánicas e inorgánicas, entre los que destacan los metales pesados como el plomo y el cadmio; estos tienen como característica la elevada toxicidad de sus sales solubles. El efecto de estos metales en los sistemas acuáticos tiene un particular interés desde el punto de vista de protección ambiental. En estos ecosistemas los componentes más importantes son: el fitoplancton y el zooplancton; estos ingieren o bioacumulan los metales y así, son transportados a todos los eslabones de la cadena trófica, incluyendo al hombre. Entre el zooplancton de agua dulce existe una gran diversidad de rotíferos, en la pasada década, se incrementó el uso de estos para conocer el estado en el que se encontraban algunos cuerpos de agua. En este sentido, mucha de la información de los estudios ecotoxicológicos con rotíferos está concentrada en especies del género *Brachionus*, mientras que el género *Anuraeopsis* ha recibido una atención pobre. El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento poblacional de *Anuraeopsis fissa* bajo el efecto de cinco concentraciones del plomo y del cadmio respectivamente, mezclados con *Chlorella vulgaris* a tres densidades (0.5, 1.0 y  $2.0 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ). Los resultados de la  $\text{CL}_{50}$  para el plomo fueron de  $0.726 \pm 0.074 \text{ mg L}^{-1}$  y de  $0.449 \pm 0.022 \text{ mg L}^{-1}$  para el cadmio, por 24 h y sin alimento. Se pudo observar que el Cd resultó 40% más tóxico para *A. fissa* que el Pb. En la prueba de toxicidad crónica (crecimiento poblacional), en general e independiente a la concentración y tipo de tóxico en el medio, la población aumentó cuando se incrementó la densidad del alimento; por otro lado, bajo cualquier densidad del alimento, un incremento en la concentración del tóxico tuvo como efecto una disminución de la población. La densidad máxima registrada fue de  $2165 \pm 48 \text{ ind. ml}^{-1}$ . La tasa de crecimiento poblacional varió de 0.315 a 0.408. Estas variables fueron influenciadas significativamente por la concentración de los metales y las densidades del alga. La alta densidad poblacional de *A. fissa*, permitió evaluar los cambios en las variables poblacionales del rotífero en los cuerpos de agua afectados por estos metales pesados, ya que es más fácil detectar pequeñas variaciones en tamaños poblacionales mayores. *Chlorella vulgaris*, en altas densidades ayudó a disminuir el efecto tóxico de los metales, sin embargo, a concentraciones altas de estos, el alga ya no pudo disminuir este efecto tóxico. Los resultados mostraron que *A. fissa* es más sensible al plomo y al cadmio que otros rotíferos (incluidas especies de la misma familia -Brachionidae-), no obstante, faltan por realizarse otras pruebas y obtener más datos, para tomar en cuenta a esta especie en las evaluaciones ambientales.

## 1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento demográfico, el desarrollo tecnológico, la industrialización y el uso de métodos de agricultura tecnificada son factores que contribuyen a que se liberen al ambiente sustancias químicas, sintéticas y naturales, cuyas interacciones afectan la integridad de los ecosistemas, ocasionando daños a veces irreversibles a los seres vivos y contribuyendo así a la pérdida de la biodiversidad (Turk, 1973; Frank et al., 1980).

El agua, es quizá donde más se hace notorio el deterioro ambiental, ya que es básica para la subsistencia de todo ser vivo (Persson, 1978). La contaminación del agua se puede definir como cualquier cambio que pueda afectar su uso posterior (desde un punto de vista antropocéntrico), dicho cambio puede ser causado por la introducción de sustancias orgánicas o inorgánicas, provenientes de las actividades humanas antes mencionadas (Acevedo, 2003).

Podemos definir dos tipos de contaminación del agua; la biológica, a través de virus, bacterias y parásitos, y la contaminación química, que en su mayoría es causada por actividades antropogénicas. Dentro de esta se incluye la contaminación por metales pesados, como: plomo, cadmio, mercurio, cromo, etc. (Vizcaíno, 1986; Seoanes, 1995). Un ejemplo de esto, es lo que muestra un análisis de los metales pesados existentes en los sedimentos del río Coatzacoalcos, en Veracruz, donde se encontraron altas concentraciones de diferentes metales pesados, entre ellos Pb, Cd, Cu y Zn. Las descargas industriales de agua adicionan mayor cantidad de estos metales en esta área (Rosales-Hoz y Carranza-Edwards, 1998).

Para que los organismos vivos lleven a cabo sus funciones fisiológicas, requieren de diversos iones inorgánicos esenciales como el cobre y el zinc. En los mamíferos, el zinc se encuentra presente en por lo menos 90 enzimas, siendo un factor determinante para la reproducción. En cuanto al cobre, es fundamental en los procesos de oxidación de los seres vivos, ya que es componente de diversas enzimas oxidativas (Whitten, 1992). Sin embargo, estos metales pesados son tóxicos cuando se encuentran en concentraciones elevadas (Walker et al., 1998). Contrario a estos, otros iones inorgánicos como el plomo y el cadmio, no tienen ninguna función fisiológica ni metabólica en los organismos (Vizcaíno, 1986).



Como ya fue mencionado, entre los metales pesados vertidos al ambiente destacan el cadmio y el plomo, estos tienen como características comunes la elevada toxicidad de sus sales solubles. Se sabe que varios metales son tóxicos para una gran variedad de seres vivos, desde microorganismos hasta el hombre (Villanueva y Botello 1998; Landis y Yu, 1999). Su toxicidad está muy relacionada con factores fisicoquímicos del medio (la salinidad, el pH, la dureza y la biodisponibilidad) y aspectos biológicos de los organismos (etapa de desarrollo, tamaño, madurez, hábitos alimenticios, y su estado fisiológico).

El plomo, conocido como veneno desde hace mucho tiempo, es tóxico para las plantas y los peces, ya que, al absorberse en estos últimos, forma una película coagulante y provoca alteraciones hematológicas; en el hombre produce trastornos nerviosos, digestivos y renales. El plomo vertido a los cuerpos de agua proviene de diversas fuentes, principalmente de actividades mineras, de la fabricación de acumuladores y de determinadas industrias químicas (Vizcaíno, 1986). El cadmio, por su parte, posee una alta toxicidad para todas las formas de vida, pudiendo ocasionar en el hombre daños en el aparato digestivo, en el aparato renal y en los huesos. Este metal es desechado por ciertas fabricas de recubrimientos metálicos, de baterías, de ciertos plásticos, de varios plaguicidas, así como en la producción de plomo, zinc, etc. (Vizcaíno, 1986).

El efecto de estos metales pesados en los sistemas acuáticos tiene un particular interés desde el punto de vista de protección ambiental en varios países, incluido México. Los ecosistemas dulceacuícolas, comúnmente tienen condiciones tróficas lineales, desde el fitoplancton, hasta los peces, pasando por el zooplancton. Por lo tanto, cualquier cambio en uno de los niveles causado por los tóxicos, tendrá consecuencias en otros niveles de esta cadena trófica simple. (Margalef, 1983).

En los sistemas acuáticos, estos metales pueden ser ingeridos o bioacumulados por el plancton y transportados a todos los eslabones de la cadena trófica. Esta vía de asimilación es una de las principales rutas de los metales pesados para los animales y para el hombre. En este último pueden causar ceguera, amnesia, raquitismo o la muerte (Vizcaíno, 1986).

En los cuerpos de agua naturales, los componentes más importantes son: el fitoplancton y el zooplancton entre otros. Dentro del fitoplancton uno de los grupos importantes son las algas verdes, cuya densidad y diversidad son controladas por el zooplancton, el cual está constituido por protozoarios, rotíferos, cladóceros, copépodos, entre otros (Margalef, 1983). De estos, los cladóceros y rotíferos son más importantes en términos de biomasa, de abundancia numérica, como presas de peces y como indicadores ambientales (Hutchinson, 1967).

Los rotíferos en particular, desempeñan una función importante en los procesos ecológicos, regulan las abundancias del fitoplancton, detritus y de bacterias, también es muy conocida su contribución en las cadenas tróficas como fuente de alimento para muchos depredadores como larvas de crustáceos y de peces (Sarma, 2000). El uso de los rotíferos para monitorear la contaminación acuática no es nuevo, en la pasada década, se incrementó el uso de los rotíferos para conocer el estado en el que se encontraban algunos cuerpos de agua (Sarma, 2000).

De los rotíferos hay unas 2000 especies descritas procedentes de las aguas dulces (aproximadamente un 95 %) y de todas las regiones litorales marinas, así como de medios semiterrestres (como los musgos y líquenes) (Meglitsch, 1978; Marshall, 1980; Barth, 1982). Son organismos que miden de 50 a 1000  $\mu\text{m}$  de largo (la mayoría alrededor de 250  $\mu\text{m}$ ). Estos organismos son solitarios y libres nadadores, aunque algunas formas son sésiles o coloniales. El cuerpo por lo general es transparente, presenta simetría bilateral, se divide en una corta región anterior, un grueso tronco que integra la mayor parte del cuerpo, y un pie terminal. Son pseudo-celomados, con un disco trocal anterior denominado corona ciliar, utilizada tanto para la alimentación como para la locomoción, dando una apariencia de rueda de la cual se deriva su nombre (Nogrady et al., 1993). Tienen una sola masa bilobulada cerebroide en posición dorsal respecto a la boca y a la faringe. También suelen tener tubo digestivo completo, con boca anterior, faringe muy diferenciada, provista de dos piezas móviles que actúan como mandíbulas y una cloaca posterior. La boca de los rotíferos es ventral y suele estar rodeada por parte de la corona ciliar, también puede continuar directamente con el mástax (faringe), o bien hay un tubo bucal ciliado entre ambas estructuras, como en los consumidores de materia suspendida (Meglitsch, 1978). El mástax es característico de todos los rotíferos y su estructura es una peculiaridad distintiva

del phylum. Dicha estructura puede ser oval o larga y bien musculada. Las paredes internas tienen siete grandes piezas prominentes interconectadas (trofos), formadas por un mucopolisacárido ácido. El mástax sirve para la captura y trituración de alimento y por consiguiente, su estructura varía según el tipo de comportamiento alimenticio del organismo. Casi todos los rotíferos son consumidores de partículas suspendidas, o bien, depredadores. El alimento es digerido en un estómago glandular que se continúa en un corto intestino y por último en un ano subterminal (Marshall, 1980; Lutz, 1986; Barnes, 1989).

La mayor parte de las poblaciones de rotíferos son hembras, ya que los machos solo se observan en determinada época y en algunas especies no se conocen. Las hembras suelen producir dos tipos de huevos, uno llamado amíctico, que tiene un cascarón delgado, no puede ser fecundado y se convierte por partenogénesis en una hembra, estos huevos son diploides; el otro tipo de huevo llamado míctico es haploide y también tiene cascarón delgado. Si no hay fecundación, estos producen machos por partenogénesis, pero, si son fecundados secretan cascarones gruesos y resistentes. Los huevos fecundados se llaman latentes y, a diferencia de los mícticos y amícticos no fecundados que eclosionan en pocos días, soportan deshidratación y otras condiciones adversas. Finalmente estos huevos dan origen a hembras (Russell-Hunter, 1979; Marshall, 1980; Lutz, 1986; Barnes, 1989; Pechenik, 1991)

El término indicador o bioindicador, significa que un organismo muestra adaptación a un cierto intervalo de factores ambientales, en los cuales se desarrolla bien (Margalef, 1983; Flores, 1999). Los bioindicadores son muy utilizados en los sistemas de determinación de la calidad del agua (Flores, 1999). Respecto a esto, los rotíferos son importantes en cuanto a la sensibilidad hacia ciertos cambios ambientales, por eso se han utilizado como organismos bioindicadores de la calidad del agua, y como especies de bioensayo en ecotoxicología acuática. (Snell y Janssen, 1995).

En cuestiones biológicas, los rotíferos tienen relevancias para las evaluaciones ecotoxicológicas, ya que cuentan con: una amplia distribución, gran diversidad, cuerpo transparente, alto consumo y eficiencia de asimilación del alimento, metabolismo acelerado, sensibilidad a cambios ambientales, alto número poblacional, tiempo generacional corto, facilidad de cultivo, estabilidad genética y su taxonomía es relativamente sencilla (Buikema et al, 1982; Sarma, 2000).

En el medio, la toxicidad de los metales pesados puede ser amortiguada por diversos factores fisicoquímicos, así también por organismos como las algas, las cuales los metabolizan o los adhieren a sus paredes celulares (Hodgson y Dauterman, 1980). Dentro de los factores que aumentan la capacidad de captación (absorción y adhesión) de los metales por las algas; están el incremento en la temperatura y la acidificación del medio. Gracias a estas propiedades, desde hace más de 50 años se han empleado a las algas en el tratamiento de aguas residuales y varios autores han establecido la utilidad potencial de las algas para la concentración, separación y detección de metales en muestras acuosas (Cervantes, 1999).

Las microalgas producen diferentes sustancias orgánicas extracelulares que proveen a la superficie celular de una gran variedad de sitios para el intercambio iónico, con los grupos amino, fosforilo, sulfhidrilo y carboxilo, que disminuyen la toxicidad de altas concentraciones de metales pesados. Se ha demostrado, por ejemplo, que en la pared celular de *Chlorella* se pueden adherir diferentes metales pesados como: Pb, Cu, Cd, Ni, Zn, Au, Ag y Hg (Cervantes, 1999).

Por otro lado el uso de las microalgas verdes es muy concurrido en estudios ecológicos, ya que estas son fáciles de cultivar en condiciones de laboratorio. A esto se debe el empleo de *Chlorella vulgaris*, ya que además, esta alga se ha utilizado como organismo para el cultivo del zooplancton y en la evaluación de trabajos ecotoxicológicos (Nandini y Sarma, 2002). Esta alga es común, sin embargo algunas veces no es muy abundante en los cuerpos de agua donde se encuentra naturalmente. Otra ventaja es que no cuenta con defensas contra organismos ramoneadores, esto la hace más apropiada para evaluar pruebas ecotoxicológicas con rotíferos. Como pasa en los cuerpos de agua naturales, la cantidad de fitoplancton es variable, dependiendo de la época del año (Margalef, 1983), es por eso que en los estudios de laboratorio se emplean diferentes

densidades de *Chlorella*, con esto se trata de simular las condiciones que podríamos encontrar en situaciones de campo; esto es: una baja, una media y una alta cantidad de fitoplancton.

En la práctica, el efecto de la valoración a los cambios ambientales está en relación con los índices de datos ecotoxicológicos y de laboratorio. La relación causal entre las observaciones de campo y las exposiciones a ciertos tóxicos debe apoyarse con investigación de laboratorio que muestre la inducción de los síntomas por exposiciones en organismos apropiados al supuesto tóxico; esto puede hacerse en pruebas de una sola especie (Gama-Flores, 1999). También, es necesario estimar el efecto del tóxico en características de vida como el tamaño de la camada, el crecimiento de la población, el comportamiento y en las variables de las tablas de vida demográficas (Forbes y Calow, 1999).

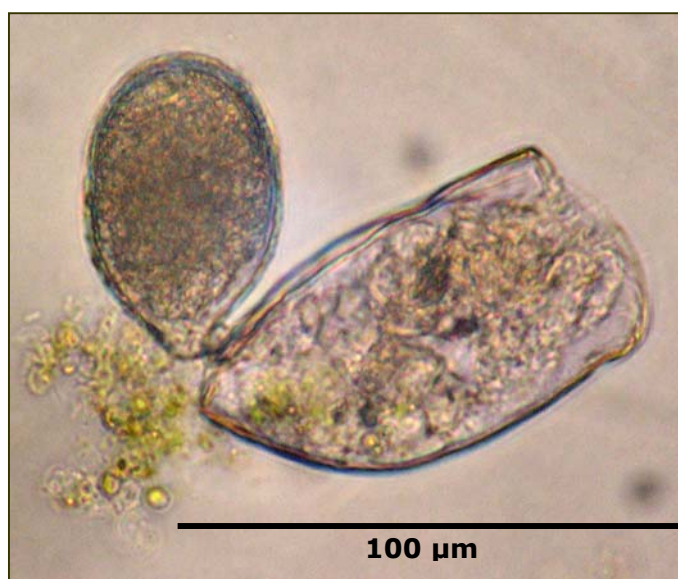
Las pruebas toxicológicas estudian los mecanismos de ingreso, transformación y excreción de los tóxicos en los organismos, así como los mecanismos a nivel molecular y celular (Kopplin, 2001), dejando un poco de lado los aspectos ecológicos, que hoy en día son indispensables para dar alternativas en cuanto a reglamentos y restricciones ambientales se refiere. La ecotoxicología conjunta varias de las herramientas que la ecología y la toxicología permiten utilizar.

Las pruebas ecotoxicológicas en los rotíferos, se conducen básicamente a dos niveles; las pruebas de toxicidad aguda y las pruebas de toxicidad crónica. Para conocer el intervalo de toxicidad de cualquier tóxico, se emplean las pruebas de tipo agudo, estas son las más sencillas y de corta duración, estos estudios indican las dosis que se utilizarán en ensayos mas prolongados; evaluándose la concentración del tóxico que es capaz de matar o inmovilizar al 50% de la población, también conocida como concentración letal media ( $LC_{50}$ ) o dosis letal media ( $LD_{50}$ ), esto significa un estímulo fuerte que ocasiona rápidamente una respuesta de envenenamiento o disfunción de los organismos, que frecuentemente los conduce a la muerte (Sarma, 2000). Esta prueba constituye solo la primera aproximación al conocimiento de la toxicidad de los compuestos. Para tener la suficiente información complementaria, se emplean los estudios crónicos o a largo plazo, estas pruebas implican administraciones repetitivas de concentraciones subletales de los tóxicos en periodos de toda la vida (en el caso de las tablas de vida) o de algunas generaciones (como en el crecimiento

poblacional). La importancia de la toxicidad crónica o subcrónica radica en que nos da información de cómo un tóxico afecta a una población a lo largo de su historia de vida (Rand y Petrocelli, 1985; Sarma, 2000).

Actualmente en México, el uso del zooplancton exótico como *Daphnia magna* está en vigencia de acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas para la evaluación toxicológica de los efluentes industriales (Acevedo, 2003). Puesto que esta no es una especie nativa, su uso para las pruebas de materiales tóxicos en nuestro país no es muy relevante. En este sentido, algunas tentativas se han hecho en México para el uso de otro tipo de zooplancton, particularmente de rotíferos en ecotoxicología acuática como indicadores de la calidad del agua (Gama-Flores, 1999).

Un estudio ecotoxicológico utilizando al rotífero *Anuraeopsis fissa* (foto 1), puede darnos información que nos permita evaluar la calidad de los cuerpos de agua naturales en donde esta especie habita. *Anuraeopsis fissa* (Gosse 1851) (Koste, 1978), es una especie que posee una distribución amplia (Koste, 1978; Ooms-Wilms et al., 1991), habita tanto en aguas templadas como en tropicales, y tiene una alta abundancia en los cuerpos de agua naturales (Dumont et al., 1995). Tiene un tamaño de  $88.67 \pm 7.17 \mu\text{m}$ , además puede ser cultivada en el laboratorio y alcanzar densidades de hasta  $6000 \text{ ind. ml}^{-1}$  (Sarma et al., 1996).



Orden: Ploima  
Clase: Monogononta  
Familia: Brachionidae  
Género: *Anuraeopsis*  
Especie: *fissa*

Foto 1. Hembra de *Anuraeopsis fissa* portando un huevo de resistencia.

## 2. ANTECEDENTES

Actualmente, es muy común el uso de rotíferos en estudios para evaluar la contaminación del agua (Vilaclara y Sládeček, 1989). Existen diversos estudios de ecotoxicología que utilizan al género *Brachionus* como organismo de bioensayo, ya que ha sido aceptado por el American Society of Testing and Materials (Sarma, 2000). La ausencia de datos sobre la biología básica (reproducción, presencia de machos, entre otros), aspectos ecológicos (tolerancia a diferentes niveles de pH, temperatura, oxígeno disuelto, entre otros) son probablemente responsables para no incluir a *Anuraeopsis fissa* en la ASTM.

Dumont et al. (1995) estudiaron la dinámica poblacional de *A. fissa* utilizando como alimento el alga *Scenedesmus obliquus* en cinco densidades, desde 0.5 hasta  $8 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ . Pudieron observar que la fase de mayor crecimiento ocurrió dentro de los primeros 7 días, donde la tasa de crecimiento varió entre  $0.457 \pm 0.067$  y  $0.856 \pm 0.090$  ind.  $\text{ml}^{-1}$ , para la baja y alta densidad de alimento respectivamente. Pudieron concluir que la población de *A. fissa*, es más estable y con un mayor tamaño ( $2500$  ind.  $\text{ml}^{-1}$ ) en condiciones de altas densidades de alimento.

El plomo y el cadmio conocidos como metales tóxicos en sus formas iónicas, han sido blanco de numerosos estudios para evaluar su efecto tanto a nivel individual como poblacional, utilizando especies de cladóceros (del género *Daphnia*) y de rotíferos (del género *Brachionus*), pero la especie *Anuraeopsis fissa* no había sido tomada en cuenta para evaluar el efecto tóxico del plomo a nivel poblacional (Snell y Janssen, 1995).

Se han realizado estudios acerca del efecto de algunos metales pesados sobre crustáceos, como el realizado por Vanegas et al. (1997), en donde evaluaron la toxicidad aguda y el sinergismo del cadmio y del zinc en organismos juveniles del camarón blanco (*Penaeus setiferus*), a una temperatura de  $23^\circ \text{C}$ , encontrando que la concentración letal media ( $\text{CL}_{50}$ ) a 96 hrs. fue de  $0.99 \text{ mg L}^{-1}$  para el cadmio, esto se atribuye a que en los organismos acuáticos, la sensibilidad hacia los metales pesados está relacionada a la actividad biológica del metal, y el cadmio no tiene ninguna función biológica. También observaron que la toxicidad de estos metales fue mayor en mezclas, comparada con la toxicidad individual del

Zn y del Cd. La exposición simultánea a ambos metales tuvo una acción sinérgica. Por otro lado, la toxicidad del cadmio se incrementó con el tiempo de exposición.

Sarma et al. (2000), trabajaron con los tres metales pesados más tóxicos en forma de cloruros (cadmio, cobre y mercurio), realizando pruebas de toxicidad aguda con dos especies de rotíferos alimentadas con *Chlorella vulgaris* en dos densidades ( $1$  y  $3 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ). *Brachionus patulus* fue más sensible al Cu y *B. calyciflorus* al Cd. A la vez se encontró que el Hg fue el más tóxico. Estos autores concluyeron que la alta densidad del alga favoreció a los rotíferos, haciéndolos más resistentes a la toxicidad de los metales.

González et al. (1998) evaluaron los efectos del cadmio y plomo en la cadena trófica marina y detectándola en la cadena trófica bentónica-demersal. Los organismos de dicha cadena se alimentan de materia orgánica en los sedimentos marinos, donde estos metales son acumulados durante todo el año en condiciones anóxicas (oxígeno mínimo). También encontraron que en condiciones hipóxicas (donde el oxígeno disuelto aumenta) los metales se solubilizan, y que un cambio en la composición normal del agua de mar puede afectar la adsorción o desorción del metal. El cadmio fue encontrado en los sedimentos de la bahía del norte de Chile en una concentración de un intervalo de 0-20  $\mu\text{g}$ .

Nelson (1998), evalúa la sensibilidad del rotífero *Brachionus calyciflorus* y del cladóceros *Ceriodaphnia dubia* a la exposición aguda de zinc, cobre, cadmio entre otros. Determinó para *C. dubia* una  $\text{CL}_{50-24 \text{ hrs-}}$  de  $132.0 \mu\text{g L}^{-1}$  y una  $\text{CL}_{50-48 \text{ hrs-}}$  de  $78.2 \mu\text{g L}^{-1}$  en organismos expuestos al cadmio.

Travieso et al. (1999) estudiaron la remoción de metales pesados (zinc, cromo y cadmio) por las algas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* utilizando el gel kappa-carrageenan y espuma de poliuretano para su inmovilización. Encontraron que *S. acutus* es más eficiente para remover metales que *C. vulgaris*, así mismo, observaron que ésta soporta concentraciones de zinc, hasta de  $600 \text{ mg L}^{-1}$ . Con respecto al cadmio, tanto *Chlorella* como *Scenedesmus* presentan problemas morfológicos en concentraciones mayores a  $2 \text{ mg L}^{-1}$ .



Cañizares-Villanueva et al. (1999) elaboraron un estudio de toxicidad aguda con *Daphnia magna* utilizando efluentes, en los cuales previamente se habían utilizado dos cultivos distintos de *Chlorella vulgaris* (algas inmovilizadas y algas en suspensión) para remover cadmio, zinc y una mezcla de ambos metales. Observaron que en general el cultivo de *Chlorella* inmovilizada tuvo un mayor porcentaje de remoción de metales y además, que los valores de CL<sub>50</sub> obtenidos para los cultivos inmovilizados, fueron más altos que los obtenidos para cultivos en suspensión.

Un estudio de Pickardt et al. (2002) demostró que la acumulación de mercurio en peces disminuye en lagos eutróficos en comparación con medios oligotróficos, es decir que, el incremento de la biomasa de algas, disminuye la acumulación de mercurio en niveles tróficos más elevados.

Dentro de las variables abióticas naturales que afectan la densidad y la composición del zooplancton, el amonio es importante (Sarma et al. 2003). Usando datos del crecimiento poblacional como herramienta, estudiaron el resultado competitivo de tres especies de cladóceros (*Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia pulex* y *Moina macrocopa*) creciendo juntas y solas con dos concentraciones de amonio (25 y 100 mg L<sup>-1</sup>) en una densidad (1X10<sup>6</sup> céls ml<sup>-1</sup>) de la microalga *Chlorella vulgaris*. Observaron que la tendencia de las tres especies fue similar; en la concentración alta del amonio el crecimiento de la población fue bajo en comparación con la concentración mas baja, sin importar la presencia o ausencia de la especie competente. Aunque el presente trabajo no es directamente comparable con lo antes mencionado, las tendencias indican que el crecimiento poblacional del zooplancton es una herramienta sensible a sustancias tóxicas en el ambiente o en los cuerpos de agua.

Sarma et al. (2001) evaluaron el impacto de cuatro concentraciones del metil paration y tres densidades de *Chlorella vulgaris* en el crecimiento poblacional del rotífero *Euchlanis dilatata*. Observaron que en general un aumento en la concentración del metil paration resultaba en una significativa reducción de las densidades poblacionales máximas, así como de la tasa de crecimiento poblacional. También, en cualquier concentración del tóxico, la población aumentaba al incrementarse las densidades del alga. Demostrando así que la interacción entre el alga y el tóxico, tiene un impacto en el crecimiento poblacional de *E. dilatata*.

En la mayoría de los trabajos se han utilizado organismos mayores a los 150  $\mu\text{m}$ , sin embargo en los cuerpos de agua también están presentes especies pequeñas como *Anuraeopsis fissa* (70-90  $\mu\text{m}$ ). Esta especie no solo es común, si no que tiene un papel muy importante, por ejemplo, contribuye a limpiar los cuerpos de agua eutroficados, gracias al consumo que realiza de una gran cantidad de microorganismos incluyendo bacterias, mientras que especies grandes como las del genero *Brachionus*, tienen una mayor preferencia por las algas verdes (Ooms-Wilmis, 1997).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Con el aumento de la industria en México, la cantidad de contaminantes vertidos al ambiente también se ha visto incrementada, esto ha presionado para que se realicen numerosos estudios científicos encaminados a detectarla y valorarla por medio de parámetros fisicoquímicos. Sin embargo, estas determinaciones solo dan información puntual del sistema bajo investigación y no de su comportamiento general en el tiempo y el espacio. Esta es la razón por la cual se ha visto la necesidad de realizar otro tipo de estudios empleando bioindicadores, ya que su permanencia en el medio nos da una panorámica temporal más amplia del proceso dinámico del cuerpo de agua en estudio. La determinación de la calidad de agua por medio de bioindicadores, se basa en observaciones de los efectos que los diversos aportes de sustancias ejercen sobre el conjunto de organismos vivos en las aguas dulces (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999; Flores, 1999). Para esto se emplean los estudios ecotoxicológicos, pero en México son pocos los trabajos que ocupan este tipo de pruebas (Alcocer y Sarma, 2002).

De acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas (NOM-AA-087-1995-SCFI), para evaluar este tipo de impactos, en nuestro país se utiliza como organismo de bioensayo al cladóceros *Daphnia magna* (Acevedo, 2003). Sin embargo, esta no es una especie nativa de México; su hábitat comprende regiones templadas, por esta razón no puede crecer naturalmente en las condiciones tropicales que se presentan en la mayoría de los cuerpos de agua de la república.

Por otro lado, en nuestro país hay una alta distribución de rotíferos. Se conocen aproximadamente 400 taxa, de los cuales se sabe que algunos son más sensibles a los cambios ambientales que *D. magna*, teniendo la ventaja de ser especies nativas y adaptadas a condiciones locales y regionales. Dentro de las diferentes familias del phylum Rotifera, la familia Brachionidae es importante, ya que es muy común y es fácil de cultivar en condiciones de laboratorio.

Mientras mucha de la información de los estudios ecotoxicológicos de los rotíferos esta concentrada en los géneros *Brachionus* y *Keratella*, otros como *Anuraeopsis* y *Platyias* han recibido una atención relativamente pobre. A pesar de que *Anuraeopsis fissa* cuenta con una distribución amplia en nuestro país, no ha sido tomado en cuenta para su uso en estudios ecotoxicológicos, por lo tanto en este trabajo, decidimos utilizar a esta especie como organismo de bioensayo. De esta manera intentamos obtener datos básicos que nos permitan saber si *Anuraeopsis fissa* cuenta con la sensibilidad necesaria para servir como alternativa o como complemento al uso del zooplancton exótico (*D. magna*) en la evaluación de la calidad de los cuerpos de agua.

#### **4. HIPÓTESIS**

La densidad del alga tendrá un papel amortiguante (hasta cierto nivel) de la toxicidad de los metales pesados (plomo y cadmio) sobre el crecimiento poblacional del rotífero *Anuraeopsis fissa*.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. General**

Evaluar el efecto de la interacción del alimento y metales pesados sobre la supervivencia y el crecimiento poblacional del rotífero *Anuraeopsis fissa*.

##### **5.2. Particulares**

- Establecer la toxicidad aguda (CL<sub>50</sub>-24 horas) de los metales pesados Cloruro de plomo (PbCl<sub>2</sub>) y Cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>) en el rotífero *Anuraeopsis fissa*.
- Estimar el efecto de la densidad del alimento (*Chlorella vulgaris*) en el crecimiento poblacional de *A. fissa*.
- Evaluar el impacto crónico de los metales pesados PbCl<sub>2</sub> y CdCl<sub>2</sub> en el crecimiento poblacional de *A. fissa*.
- Evaluar la interacción de los metales y la densidad del alimento en la respuesta poblacional de *A. fissa*.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Microalga

La microalga (*Chlorella vulgaris*), que se utilizó como alimento, se cultivó de manera masiva en botellas transparentes de aproximadamente 2000 ml, se colocó en medio Bold basal (ver anexo 1; Borowitzka y Borowitzka, 1988) y posteriormente las botellas se llenaron con 1800 ml de agua destilada adicionando 0.5 g de bicarbonato de sodio (como fuente de carbono); las botellas se inocularon con el alga a una densidad inicial de  $0.5 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ . Las botellas se mantuvieron bajo aireación y luz artificial constante (entre 2000 y 3000 lux) a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ . Respecto a la cosecha, esta se realizó una vez que la alga se encontró en su fase de crecimiento exponencial (aproximadamente  $25 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ), alcanzada entre los 7 y 10 días. Una vez que los cultivos llegaron a esta fase, se retiraron de la luz y se dejaron sedimentar en un cuarto frío a una temperatura de  $4^\circ \text{C}$ . Posteriormente se decantó el contenido de cada una de las botellas hasta dejar el sedimento lo más concentrado posible. Esta alga concentrada se guardó bajo refrigeración y cada tercer día se utilizó un nuevo cultivo. Las densidades de microalga deseadas (en células  $\text{ml}^{-1}$ ) se establecieron mediante el uso de la Cámara de Neubauer y un microscopio óptico marca NIKON y se prepararon por dilución con la cantidad correspondiente de la solución EPA (ver anexo 1; Anónimo, 1985).

### 6.2. Rotífero

*Anuraeopsis fissa* fue colectado en un pequeño cuerpo de agua temporal de la Universidad Autónoma de Puebla. Se mantuvo una cepa del rotífero libre de otros organismos (como protozoarios y otros rotíferos) en un vaso de precipitados de 500 ml con medio de cultivo EPA (ver anexo 1; Anónimo, 1985) y una densidad de alimento (*Chlorella vulgaris*) de  $1.0 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$  a una temperatura de  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ , con un periodo continuo de luz difusa y un pH de 7.5. Cada dos días a la cepa de *Anuraeopsis*, se le cambió el medio de cultivo por otro de las mismas características, utilizando una malla con una abertura de  $25 \mu\text{m}$  para filtrar a los rotíferos y posteriormente depositarlos en el nuevo medio. Cuando la densidad del rotífero en el cultivo era mayor a  $100 \text{ ind. ml}^{-1}$ , se retiraba una parte de ellos y se inicia un nuevo cultivo, esto para evitar la reproducción sexual.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

### 6.3. Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) (fase de toxicidad aguda)

Para esta prueba se colocaron 50 ml de las diferentes concentraciones de los metales (PbCl<sub>2</sub> y CdCl<sub>2</sub>), más el testigo (0.125, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg L<sup>-1</sup>), por separado en vasos de vidrio de 100 ml. Cada vaso (conteniendo la concentración correspondiente) se inoculó con 50 individuos (de diferentes edades). Cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado. Se mantuvieron durante 24 horas sin alimento a 25±2° C, con luz continua difusa y un pH de 7.5. Transcurrido este tiempo se procedió al conteo de los organismos supervivientes de cada vaso con la ayuda de un microscopio estereoscópico marca NIKON, registrando los resultados para su posterior análisis.

Una vez obtenidos la totalidad de los datos, se capturaron en una hoja de calculo para analizarlos y utilizando el Método Probit o Método de las Unidades Probabilísticas (anexo 2) (el cual se basa en el porcentaje de mortalidad de una población) se derivó la CL<sub>50</sub> (Finney, 1971).

### 6.4. Crecimiento poblacional (fase de toxicidad crónica)

Una vez obtenida la CL<sub>50</sub>, se derivaron 5 concentraciones subletales (dividiendo la CL<sub>50</sub> correspondiente a cada metal entre 100; tabla 1), más el testigo para la prueba de crecimiento poblacional. Se colocaron las 5 concentraciones de los metales pesados (por separado) mezclados con 3 niveles de alimento (0.5, 1.0 y 2.0X10<sup>6</sup> céls. ml<sup>-1</sup>) el cual consistió en la microalga *Chlorella vulgaris*, en vasos de vidrio de 100 ml.

Tabla 1. Concentraciones subletales utilizadas en el experimento de la fase crónica. Concentraciones en mg L<sup>-1</sup> para cada uno de los metales.

METAL	CONC. 1	CONC. 2	CONC. 3	CONC. 4	CONC. 5
PbCl <sub>2</sub>	0.0064	0.0128	0.0256	0.0512	0.1024
CdCl <sub>2</sub>	0.0008	0.0016	0.0032	0.0064	0.0128

Las soluciones tanto del alga como de los metales pesados (Pb y Cd) se prepararon al doble de su concentración original, ya que en los vasos se colocaron 12.5 ml de cada una, quedando un volumen de 25 ml por vaso y así diluidas a la concentración deseada (técnica de dilución de la concentración). Cada vaso conteniendo el medio correspondiente se inoculó con 2 ind. ml<sup>-1</sup>. Los tratamientos se realizaron cada uno con tres replicas. Se utilizó un sistema de conteo diario de la población utilizando una pipeta Pasteur para succionar a los rotíferos. Cuando la densidad del rotífero fue menor de 10 ind. ml<sup>-1</sup> se realizó un conteo total de la población; cuando el número sobrepasaba esta densidad, el conteo se efectuó tomando tres alícuotas de 1 ml c/u con una pipeta de precisión (los datos de las tres alícuotas se sumaron y se obtenía el promedio, este contaba como un solo dato). Después del conteo de cada día se realizó el cambio total del medio por uno de las mismas características, al igual que el transvase de los organismos, utilizando una malla con una abertura de 25 µm. Todo lo anterior se realizó para cada uno de los metales por separado (utilizándolos en concentraciones nominales: PbCl<sub>2</sub> y CdCl<sub>2</sub>). Los experimentos terminaron cuando la población de cada replica comenzó a mostrar una disminución (aproximadamente a los 20 días).

Para obtener las concentraciones deseadas del alga y de los metales, se empleó la siguiente fórmula (Peña, 2003):

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad \dots \rightarrow \quad V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

Donde:

**C<sub>1</sub>**: Solución concentrada (céls. ml<sup>-1</sup> ó mg L<sup>-1</sup>)

**V<sub>1</sub>**: Volumen necesario para preparar la solución de la concentración 2 (ml)

**C<sub>2</sub>**: Concentración a la que se desea preparar la dieta o el metal (céls. ml<sup>-1</sup> ó mg L<sup>-1</sup>)

**V<sub>2</sub>**: Volumen final de la concentración que se desea preparar (ml)

Las posteriores concentraciones de los metales, se obtuvieron a partir de una solución madre o "stock" que se preparó con agua destilada a una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup>. A estas se les adicionó la correspondiente cantidad del medio de cultivo EPA para diluirlas y así obtener las concentraciones deseadas. Las densidades del alga se obtuvieron de una forma similar, siendo que la solución madre varió de acuerdo al concentrado de la cosecha.

Para evaluar el impacto tóxico, de los datos registrados de las respuestas de *A fissa*, se derivaron las siguientes variables:

- 1) Concentración letal media (CL<sub>50</sub>), por medio del Método Probit (anexo 2).
- 2) Curva de crecimiento poblacional.
- 3) Abundancia máxima; se tomaron los datos (número de ind. ml<sup>-1</sup>) donde la población mostró la máxima densidad poblacional.
- 4) Día de abundancia máxima; fue el día en que la población alcanzó su máximo crecimiento.
- 5) Tasa de crecimiento poblacional; se calculó mediante la siguiente formula (Krebs, 1985):

$$r = \frac{(\ln N_t - \ln N_0)}{t}$$

En donde:

- r:** Tasa de crecimiento poblacional.
- N<sub>t</sub>:** Densidad al tiempo t (ind ml<sup>-1</sup>).
- N<sub>0</sub>:** Densidad inicial.
- t:** Tiempo en días.
- Ln:** Logaritmo natural.

Las variables se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA (análisis de varianza) de dos vías (densidad de alimento y concentración del metal) (Sokal y Rohlf, 1981). Complementario a esto, se realizó la prueba de Tukey, con el fin de detectar las diferencias altamente significativas (p<0.001) entre los niveles. Para esto fue necesario formar grupos, correspondientes a las tres densidades de alimento, esto es: grupo 1= 0.5X10<sup>6</sup> céls. ml<sup>-1</sup>; grupo 2= 1.0X10<sup>6</sup> céls. ml<sup>-1</sup> y grupo 3= 2.0X10<sup>6</sup> céls. ml<sup>-1</sup>.



## 7. RESULTADOS

### 7.1. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL<sub>50</sub>)

Las figuras 1 y 2 muestran la intersección de las cuales se obtuvieron los valores de las concentraciones letales medias para ambos metales.

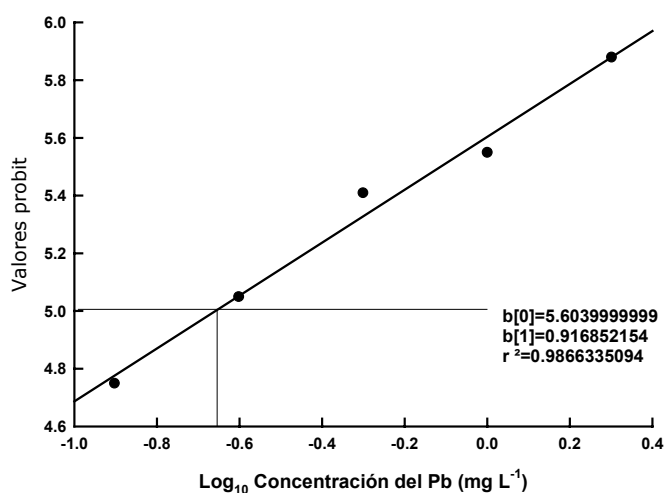


Figura 1. Toxicidad aguda para *A. fissa*, expuesto a 5 diferentes concentraciones de  $\text{PbCl}_2$ , sin alimento por 24 hrs. Se muestra la regresión lineal de los porcentajes de mortalidad convertidos a valores probit y el punto medio de intersección. Valores promedio de cuatro replicas.

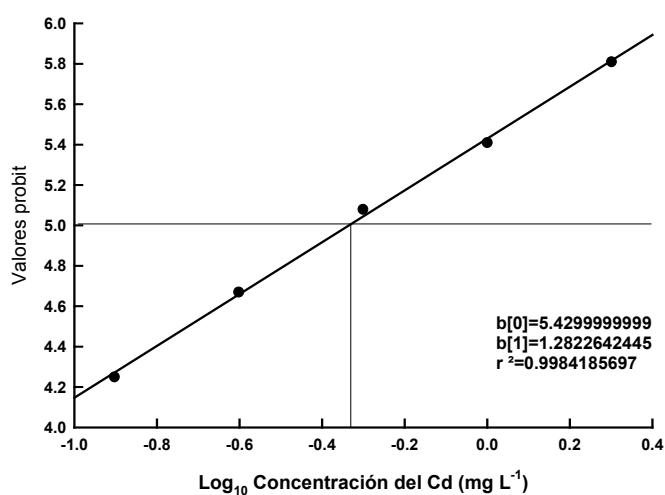


Figura 2. Toxicidad aguda para *A. fissa*, expuesto a 5 diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$ , sin alimento por 24 hrs. Se muestra la regresión lineal de los porcentajes de mortalidad convertidos a valores probit y el punto medio de intersección. Valores promedio de cuatro replicas.

Las dosis determinadas para *Anuraeopsis fissa* por 24 hrs y sin alimento para ambos metales ( $\text{PbCl}_2$  y  $\text{CdCl}_2$ ), se muestran en la tabla 2. Siendo que el Cd resultó casi dos veces mas tóxico para *A. fissa* que el Pb.

Tabla 2. Resultados de la prueba de toxicidad aguda para *A. fissa*. Valores derivados usando el Método Probit, los valores representan el promedio  $\pm$  EE, basado en seis concentraciones de cada metal y cuatro replicas para cada concentración. Estos experimentos se realizaron sin alimento.

<b>Especie</b>	<b>Metal</b>	<b>Tiempo (horas)</b>	<b>CL<sub>50</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b><i>Anuraeopsis fissa</i></b>	<b>PbCl<sub>2</sub></b>	<b>24 horas</b>	<b>0.726<math>\pm</math>0.074</b>
	<b>CdCl<sub>2</sub></b>	<b>24 horas</b>	<b>0.449<math>\pm</math>0.022</b>

## **7.2. CRECIMIENTO POBLACIONAL BAJO EL EFECTO DEL PLOMO**

La tendencia general del crecimiento poblacional de *A. fissa* bajo 6 diferentes concentraciones de Pb (0.0 (=testigo), 0.0064, 0.0128, 0.0256, 0.0512 y 0.1024 mg L<sup>-1</sup>) y tres densidades de alimento (0.5, 1.0 y 2.0X10<sup>6</sup> céls ml<sup>-1</sup>), fue variada dependiendo de la concentración del tóxico así como del alimento. En general e independiente a la densidad del tóxico en el medio, la población aumentó su número cuando aumentaba la densidad del alimento; por otro lado, bajo cualquier densidad del alimento seleccionado, un incremento en la concentración del tóxico tuvo como efecto una disminución en la abundancia de la población.

En las curvas sobre el crecimiento poblacional de *A. fissa* (figura 3) bajo diferentes concentraciones de Pb y una densidad de alimento baja (0.5X10<sup>6</sup> céls ml<sup>-1</sup>), se puede observar que independiente a la concentración de Pb, la población del rotífero, alcanzó su fase exponencial después de la primer semana, esta fase duró aproximadamente dos semanas en la mayoría de los tratamientos y después la densidad poblacional se estabilizó. Sin embargo, el aumento en la concentración de Pb en el medio causó una disminución en las densidades poblacionales de *A. fissa*. Se pudo observar que la tendencia fue una disminución de la población cuando se aumenta la concentración del metal en el medio. El caso mas notorio de la reducción en la fase exponencial, se presentó en la alta concentración del Pb (0.1024 mg L<sup>-1</sup>). La tendencia del crecimiento poblacional de *A. fissa* en el testigo y en la baja concentración del plomo (0.0064 mg L<sup>-1</sup> de Pb) fue muy semejante.

En la figura 4, se muestra el crecimiento poblacional de *A. fissa* alimentado con una densidad intermedia ( $1.0 \times 10^6$  céls  $\text{ml}^{-1}$ ), en este tratamiento se pudo observar la misma tendencia con respecto al comienzo de la fase exponencial, la cual se presentó después de la primer semana, con una duración entre siete y catorce días. Aquí también se observó una disminución poblacional en las altas concentraciones del Pb ( $0.1024 \text{ mg L}^{-1}$ ). La fase de adaptación duró más tiempo con el aumento de la toxicidad del Pb en el medio. Aunque, independientemente al tóxico, se muestra un aumento en la densidad de la población con respecto a la población alimentada con  $0.5 \times 10^6$  céls  $\text{ml}^{-1}$  de *Chlorella*.

Aumentando hasta  $2.0 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ , la población tuvo un alto crecimiento poblacional muy marcado, aun en las altas concentraciones del Pb (figura 5). La población de *A. fissa* alcanzó valores no registrados en los dos tratamientos con menor densidad de alimento. En este tratamiento, al igual que en los anteriores, la fase exponencial se presentó después de la primer semana, durando entre 7 y 14 días. Se pudo observar que, independientemente a la densidad del alimento en el medio, un aumento en la concentración del Pb propició una disminución en el tamaño poblacional del rotífero. Pero con la alta concentración del Pb la fase exponencial se retrasó unos 9 días.

### **7.3. DÍA DE ABUNDANCIA MÁXIMA**

Evaluando el efecto del tóxico y la densidad del alga sobre el día de abundancia máxima (figura 6), la mayoría de los tratamientos alcanzaron su abundancia máxima entre 15 y 19 días, sin embargo hubo una tendencia de disminución sobre el día de abundancia máxima con respecto del Pb. El análisis de varianza de dos vías mostró que el día de abundancia máxima fue influenciado por la densidad del alimento, la concentración del plomo y sus interacciones ( $p < 0.01$ , ANOVA, tabla 3). Por otro lado, el análisis realizado a los tratamientos con la prueba de Tukey, reveló que no hay diferencias significativas al interior de los grupos pero sí entre estos (Anexo 4, tabla 7).

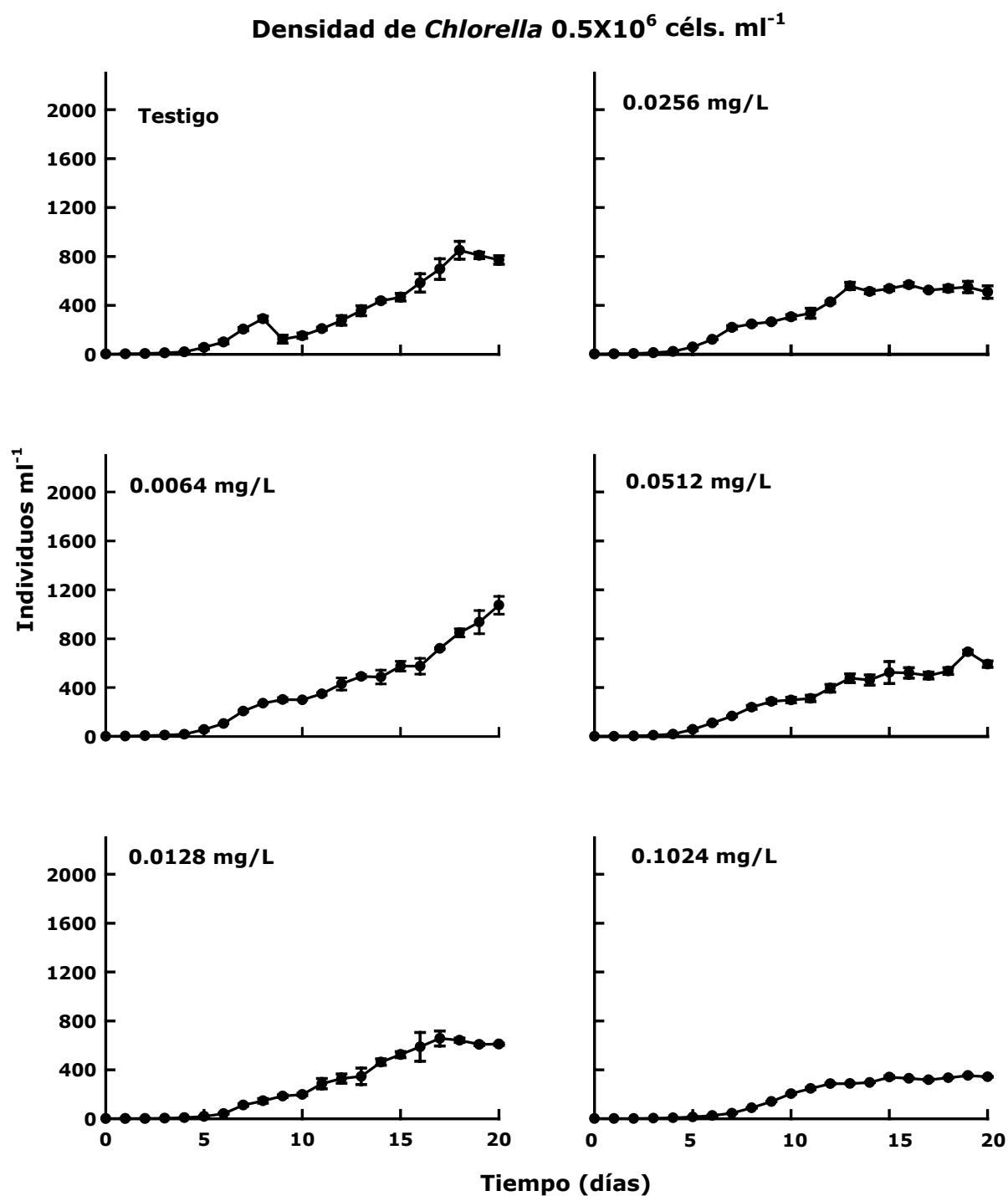


Figura 3. Curvas del crecimiento poblacional de *A. fissa*, alimentado con una densidad de *Chlorella* de  $0.5 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$  y bajo diferentes concentraciones de  $\text{PbCl}_2$  más el testigo. Los puntos muestran los valores promedio de tres replicas  $\pm$ EE.

Densidad de *Chlorella*  $1.0 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$

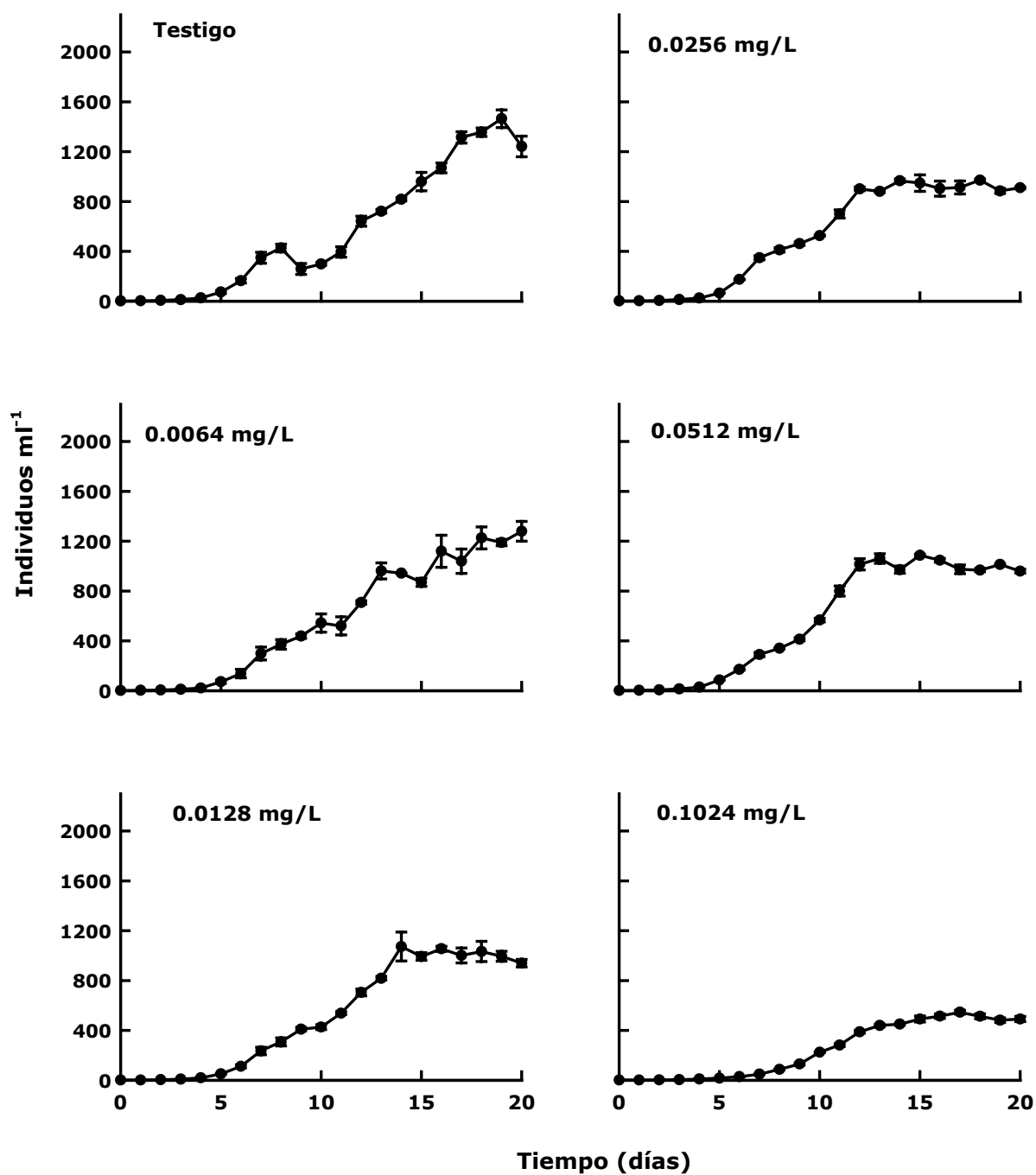


Figura 4. Curvas del crecimiento poblacional de *A. fissa*, alimentado con una densidad de *Chlorella* de  $1.0 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$  y bajo diferentes concentraciones de  $\text{PbCl}_2$  más el testigo. Los puntos muestran los valores promedio de tres replicas  $\pm$ EE.

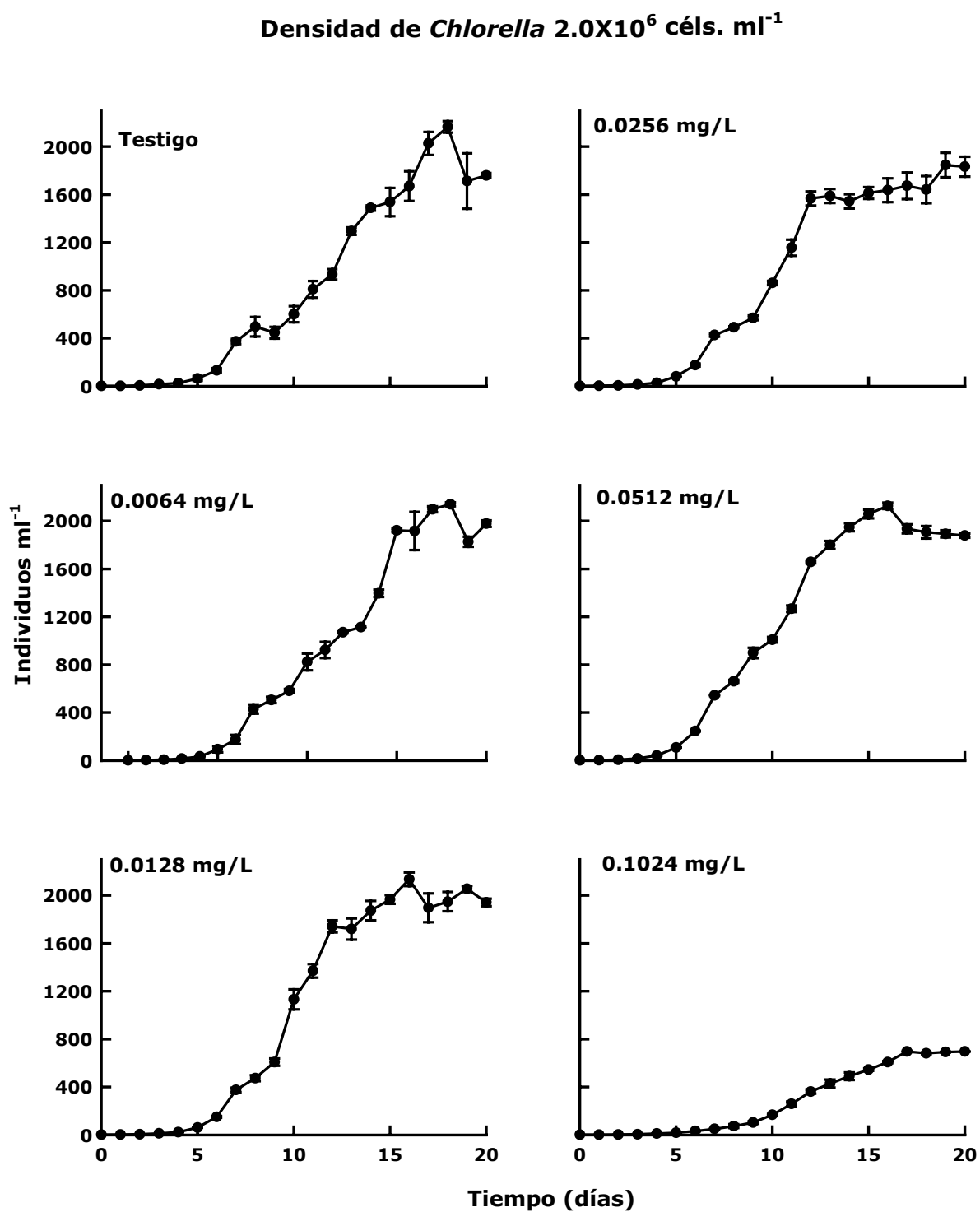


Figura 5. Curvas del crecimiento poblacional de *A. fissa*, alimentado con una densidad de *Chlorella* de  $2.0 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$  y bajo diferentes concentraciones de  $\text{PbCl}_2$  más el testigo. Los puntos muestran los valores promedio de tres replicas  $\pm$ EE.

#### 7.4. DENSIDAD MÁXIMA POBLACIONAL

La densidad máxima (figura 7) se vio influenciada por la disponibilidad de alimento en el medio, no solo en el testigo, sino también en las concentraciones del Pb. En general hubo una disminución en la densidad máxima independientemente a la densidad del alimento, con el aumento del metal en el medio. Los valores variaron entre  $356 \pm 3$  ind.  $\text{ml}^{-1}$  (baja densidad de alimento y alta concentración del tóxico) a  $2165 \pm 48$  ind.  $\text{ml}^{-1}$  (alta densidad de alimento en el testigo). Hubo una tendencia de disminución del efecto tóxico del metal en las densidades del alga baja e intermedia ( $0.5$  y  $1.0 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ), pero esta tendencia no aparece en la alta densidad del alimento ( $2.0 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ). Estadísticamente la densidad máxima fue influenciada significativamente por la concentración del tóxico, la densidad del alimento y su interacción ( $p < 0.01$ , ANOVA, tabla 3). De acuerdo a la prueba de Tukey, existen pocas diferencias significativas en el interior del grupo 1 (baja densidad de *Chlorella*:  $0.5 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ) y 2 (alta densidad:  $2.0 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ), siendo más significativas las de los tratamientos con la concentración alta del metal. Al interior del grupo 2 (densidad intermedia:  $1.0 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ), se pueden observar el mayor número de diferencias entre los tratamientos con el metal. Además, la prueba mostró que existen diferencias significativas entre los grupos 1, 2 y 3 (Anexo 4, tabla 8).

#### 7.5. TASA DE CRECIMIENTO POBLACIONAL

La tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) en el testigo (figura 8), aumentó al haber una mayor disponibilidad de alimento en el medio, de  $0.343 \pm 0.0007$  en la baja densidad de alimento a  $0.407 \pm 0.0002$  en la alta densidad del mismo. Sin embargo, la tasa de crecimiento poblacional en presencia del plomo, tuvo una disminución en cualquier concentración del alga, con respecto al testigo. Se pudo observar que un aumento en la densidad del alga en el medio disminuyó el efecto tóxico del metal. Esto, se observa claramente en las gráficas (figura 8), donde las tasas alcanzadas en la mayor densidad del alimento son significativamente mayores a las alcanzadas en la menor densidad del alga ( $p < 0.001$ , ANOVA, tabla 3). La concentración del plomo en cualquier densidad del alga, tuvo un efecto negativo en la tasa de crecimiento. Por ejemplo la tasa varió de  $0.2573 \pm 0.0006$  (alta densidad de *Chlorella* y  $0.1024$  mg  $\text{L}^{-1}$  de Pb) a  $0.3448 \pm 0.0006$  (alta densidad de *Chlorella* y  $0.0064$  mg  $\text{L}^{-1}$  de Pb). La tasa se vio influenciada

significativamente por la densidad de alimento, la concentración del metal y sus interacciones ( $p < 0.001$ , ANOVA, tabla 3). De acuerdo con la prueba de Tukey existen diferencias significativas entre los grupos (1, 2 y 3) y al interior de cada uno de ellos, presentándose las diferencias más significativas al interior de los grupos 1 y 2 (Anexo 4, tabla 9).

## **7.6. CRECIMIENTO POBLACIONAL BAJO EL EFECTO DEL CADMIO**

En general, el crecimiento de la población de *A. fissa* bajo las diferentes concentraciones del Cd (0.0008, 0.0016, 0.0032, 0.0064 y 0.0128 mg L<sup>-1</sup>) y tres densidades de alimento (0.5, 1.0 y 2.0X10<sup>6</sup> céls ml<sup>-1</sup>), fue diferente dependiendo de la concentración del tóxico, así como de la densidad del alimento. De manera independiente a la densidad del tóxico, se pudo observar una tendencia hacia el aumento de la población cuando se incrementa en el medio la cantidad de microalga. Por otro lado, bajo cualquier densidad del alimento seleccionado, un incremento en la concentración del metal, tuvo como efecto la disminución en el número de individuos de la población.

Las curvas sobre el crecimiento poblacional de *A. fissa* bajo diferentes concentraciones del Cd y una densidad de alimento baja (0.5X10<sup>6</sup> céls. ml<sup>-1</sup>), se muestran en la figura 9. En estas gráficas se puede observar que independiente a la concentración del Cd, la población del rotífero alcanzó su mayor fase de crecimiento (fase exponencial) después de la primer semana. En el testigo y las dos primeras concentraciones del tóxico (0.0008 y 0.0016 mg L<sup>-1</sup>), esta fase duró aproximadamente dos semanas, algo distinto a las otras tres concentraciones del tóxico, en las cuales la fase exponencial se presentó durante la primer semana (entre los primeros dos y cuatro días) del experimento, durando entre una y dos semanas. En la mayoría de los tratamientos la densidad poblacional se estabilizó. Sin embargo, el aumento en la concentración del Cd en el medio causó una disminución en las densidades poblacionales de *A. fissa*. Se observa que la tendencia fue una disminución de la población cuando se aumentó la concentración del metal en el medio. El caso mas notorio de la reducción en la fase exponencial, se presentó en la concentración mas alta del Cd (0.0128 mg L<sup>-1</sup>).



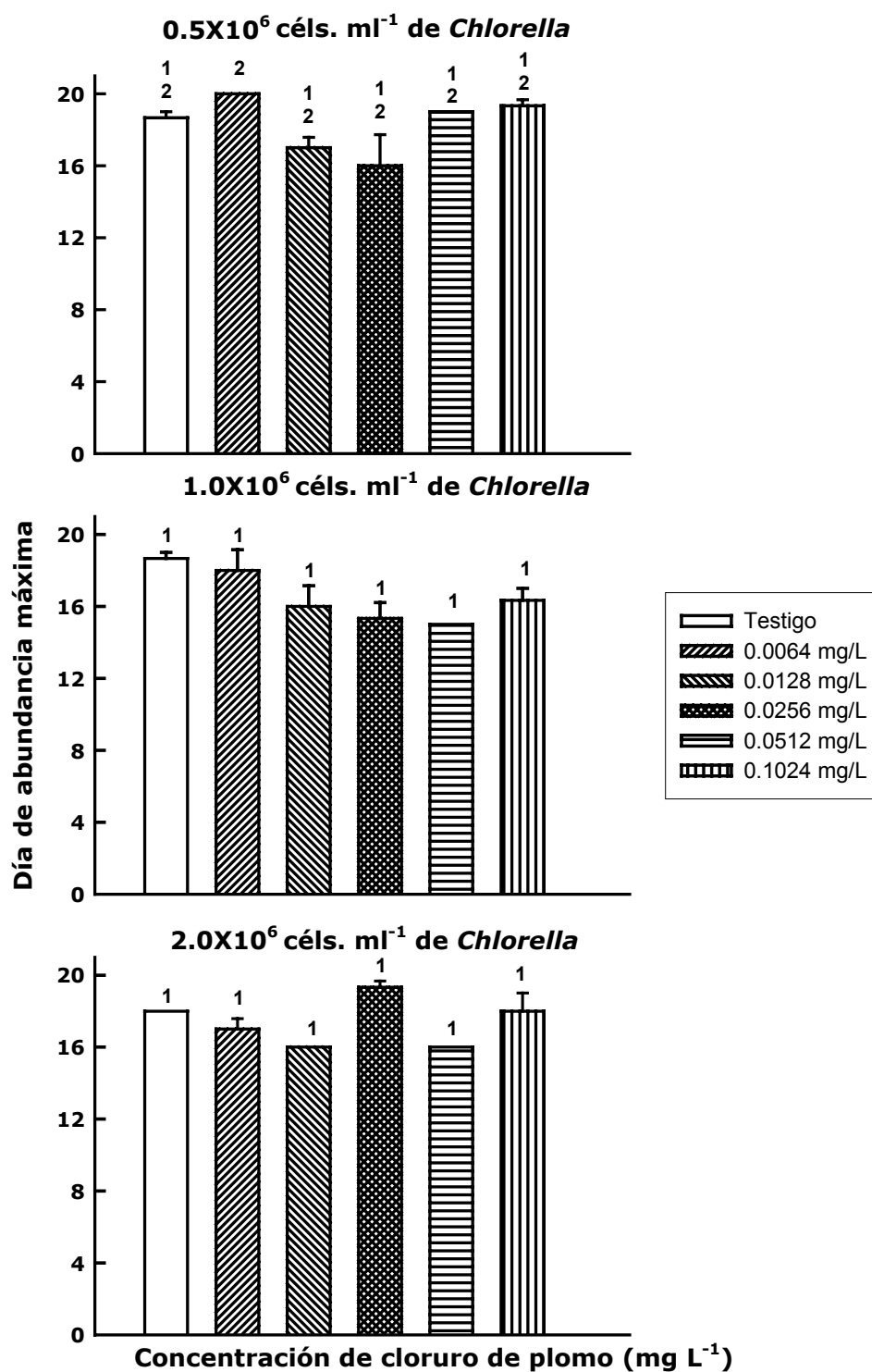


Figura 6. Gráficas del día de abundancia máxima de *A. fissa*, bajo tres densidades de *Chlorella* y cinco concentraciones de PbCl<sub>2</sub> más el testigo. Se muestran los valores promedio de tres repeticiones  $\pm$ EE. Las barras con en mismo número, no tienen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

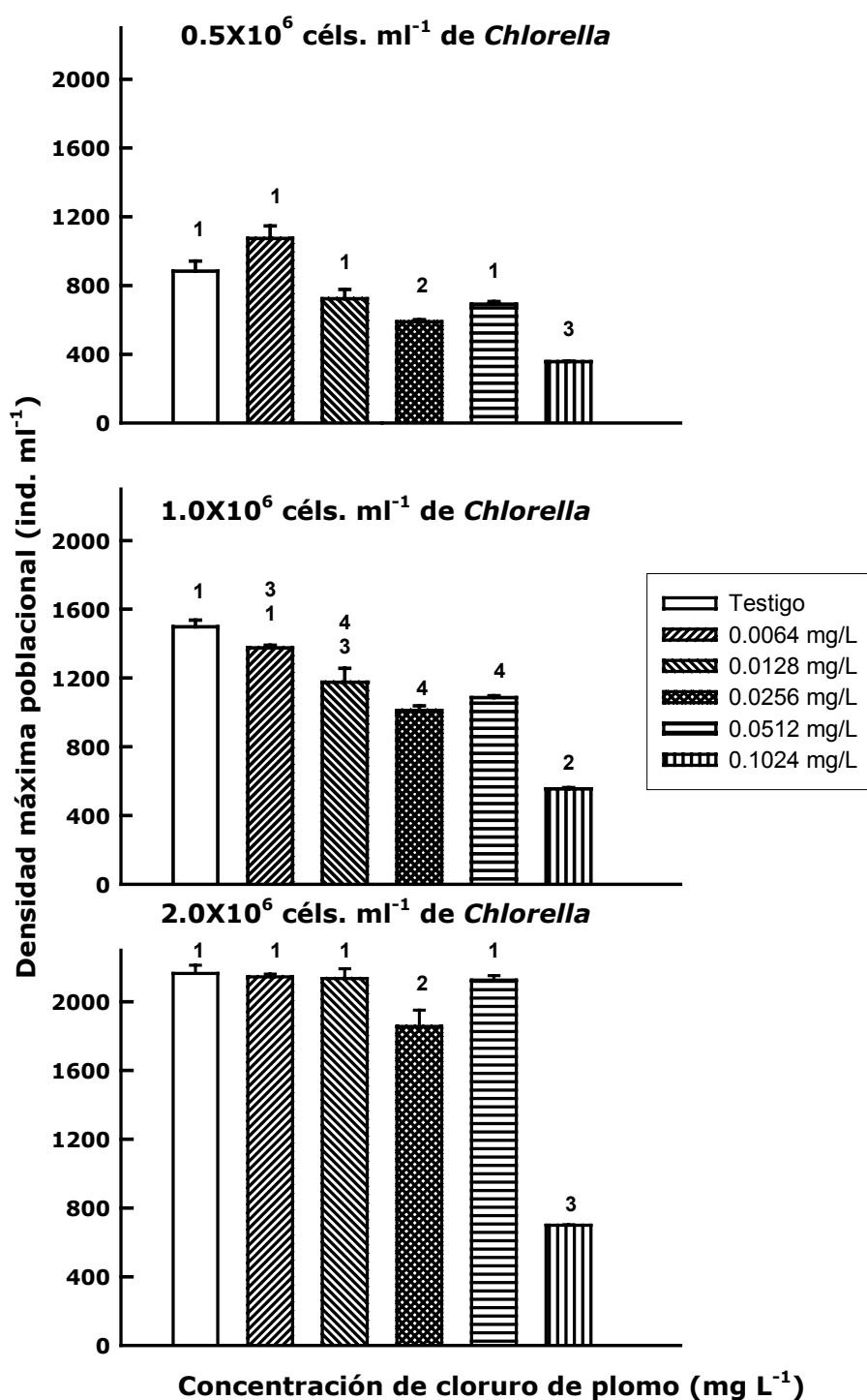


Figura 7. Gráficas de la densidad máxima de *A. fissa*, bajo tres densidades de *Chlorella* y 5 concentraciones de PbCl<sub>2</sub> más el testigo. Se muestran los valores promedio de tres repeticiones  $\pm$ EE. Las barras con en mismo número, no tienen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

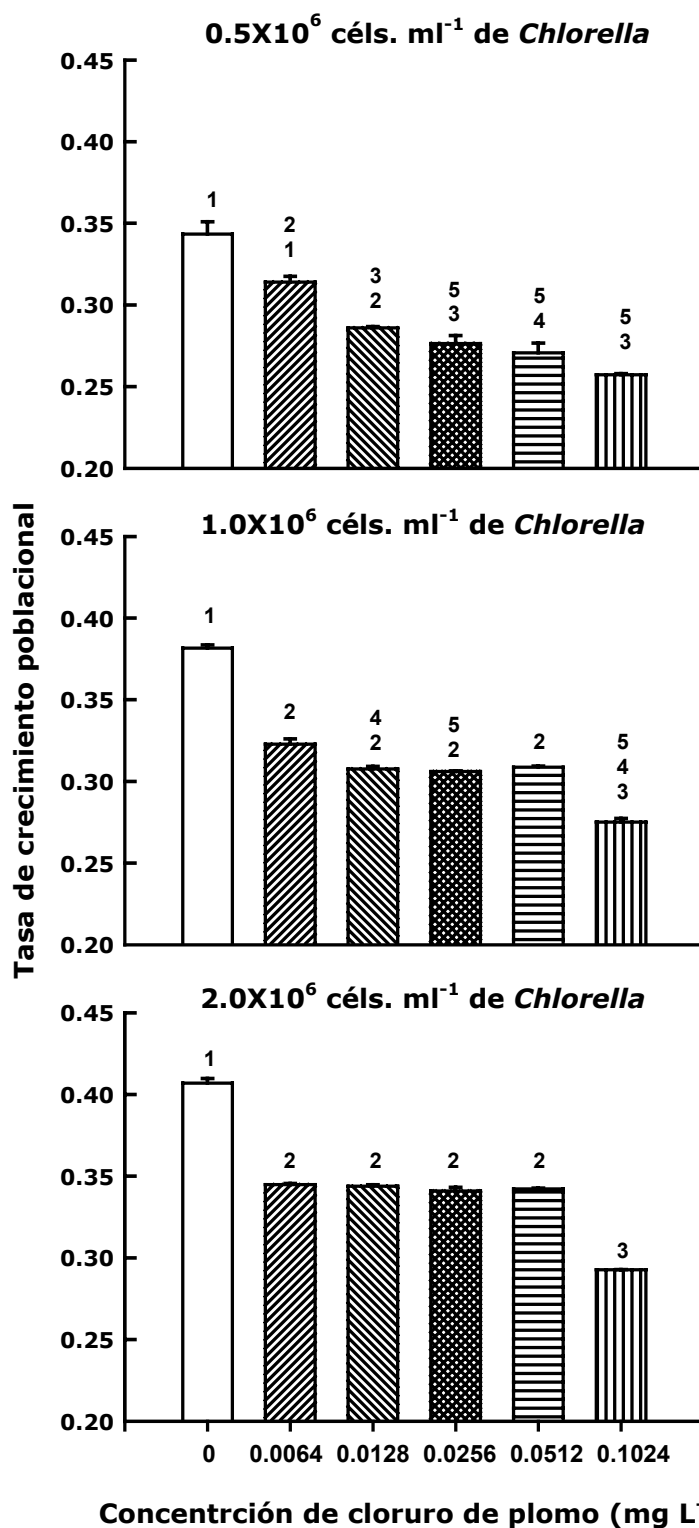


Figura 8. Gráficas de la Tasa de Crecimiento Poblacional de *A. fissa*, bajo tres densidades de *Chlorella* y cinco concentraciones de PbCl<sub>2</sub> más el testigo. Se muestran los valores promedio de tres repeticiones  $\pm$ EE. Las barras con en mismo número, no tienen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

Tabla 3. Datos con análisis de varianza del crecimiento poblacional de *Anuraeopsis fissa* bajo la interacción de alimento (*Chlorella vulgaris* a tres densidades ( $0.5$ ,  $1.0$  y  $2.0 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ ) y cinco concentraciones de cloruro de plomo ( $0.0064$ ,  $0.0128$ ,  $0.0256$ ,  $0.0512$  y  $0.1024$   $\text{mg L}^{-1}$ ) mas el testigo.

Fuente	GL	SC	MC	F
<b>Día de abundancia máxima.</b>				
Densidad del alga (A)	2	28.480	14.24	9.49***
Concentración del Pb (B)	5	37.203	7.44	4.82**
Interacción A X B	10	55.520	5.55	3.08**
Error	36	54.000	1.50	
<b>Densidad máxima.</b>				
Densidad del alga (A)	2	11937872.00	5968936.00	972.77***
Concentración del Pb (B)	5	6074192.00	1214838.40	192.49***
Interacción A X B	10	1453224.00	145322.40	19.7***
Error	36	220896.00	6136.00	
<b>Tasa de crecimiento poblacional.</b>				
Densidad del alga (A)	2	0.030	0.02	272.90***
Concentración del Pb (B)	5	0.055	0.01	95.20***
Interacción A X B	10	0.005	0.00	7.41***
Error	36	0.002	0.00	

GL = Grados de libertad, SC = Suma de cuadrados, MS = Media de suma de cuadrados, F = proporción:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*),  $p > 0.05$  (ns).

En cuanto a la densidad intermedia del alimento ( $1.0 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ) (figura 10), en general el crecimiento poblacional del rotífero muestra una tendencia a disminuir su población cuando el incremento del Cd en el medio es mayor. Aquí la fase exponencial del testigo es la mas prolongada (10 días), comenzando en los primeros tres días del experimento a diferencia de los tratamientos con el metal, en donde, si bien, en algunos casos la fase exponencial comienza en la primer semana, el tiempo de duración no es tan prolongado como en el testigo (ej.  $0.0032$  y  $0.0064$   $\text{mg L}^{-1}$ ). En la alta concentración del tóxico ( $0.0128$   $\text{mg L}^{-1}$ ), la fase exponencial se prolongó mas que en el testigo (19 días), con la diferencia de que el número de individuos de la población fue menor.

La figura 11, muestra las curvas del crecimiento poblacional con la densidad alta de alimento ( $2.0 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ). En estas curvas se muestra la misma tendencia que en las densidades de *Chlorella* anteriores, ya que aun en esta densidad de alimento, un incremento en la concentración del metal en el medio, llevó a una disminución en el crecimiento de la población. En el testigo la fase de mayor crecimiento (fase exponencial), se presentó después del tercer día, durando 9 días, en las dos siguientes concentraciones del Cd ( $0.0008$  y  $0.0016$   $\text{mg L}^{-1}$ ), la fase exponencial comenzó después de la primer semana. En la ultima concentración del metal ( $0.0128$   $\text{mg L}^{-1}$ ), la fase exponencial inició desde el primer día y se prolongó por mas de dos semanas.

### **7.7. DÍA DE ABUNDANCIA MÁXIMA**

Evaluando el efecto del cadmio y la densidad del alga sobre el día de abundancia máxima (figura 12), se observó que este fue influenciado significativamente por la concentración del metal ( $p < 0.001$ , ANOVA de dos vías, tabla 4), ya que, en la mayoría de los tratamientos la población requirió un mayor tiempo para alcanzarlo, haciéndose mas evidente en la alta concentración del metal ( $0.0128$   $\text{mg L}^{-1}$ ). Con respecto al testigo, hubo una tendencia en cuanto al pico de la población, presentándose alrededor de los 12 días. Independientemente del tratamiento (alimento y cadmio), el tiempo para alcanzar los picos máximos varió entre 12 y 19 días. La densidad del alimento no influenció significativamente el día de abundancia máxima ( $p > 0.05$ , ANOVA, tabla 4). Por otro lado, el aumento de la concentración del cadmio en el medio, aumentó el tiempo en el que *A. fissa* alcanzó sus máximos poblacionales. La prueba de Tukey confirmó que entre los grupos no hay diferencias significativas, sin embargo esta prueba detectó que dentro de los grupos si hay diferencias significativas en los tratamientos con el cadmio (Anexo 4, tabla 10).

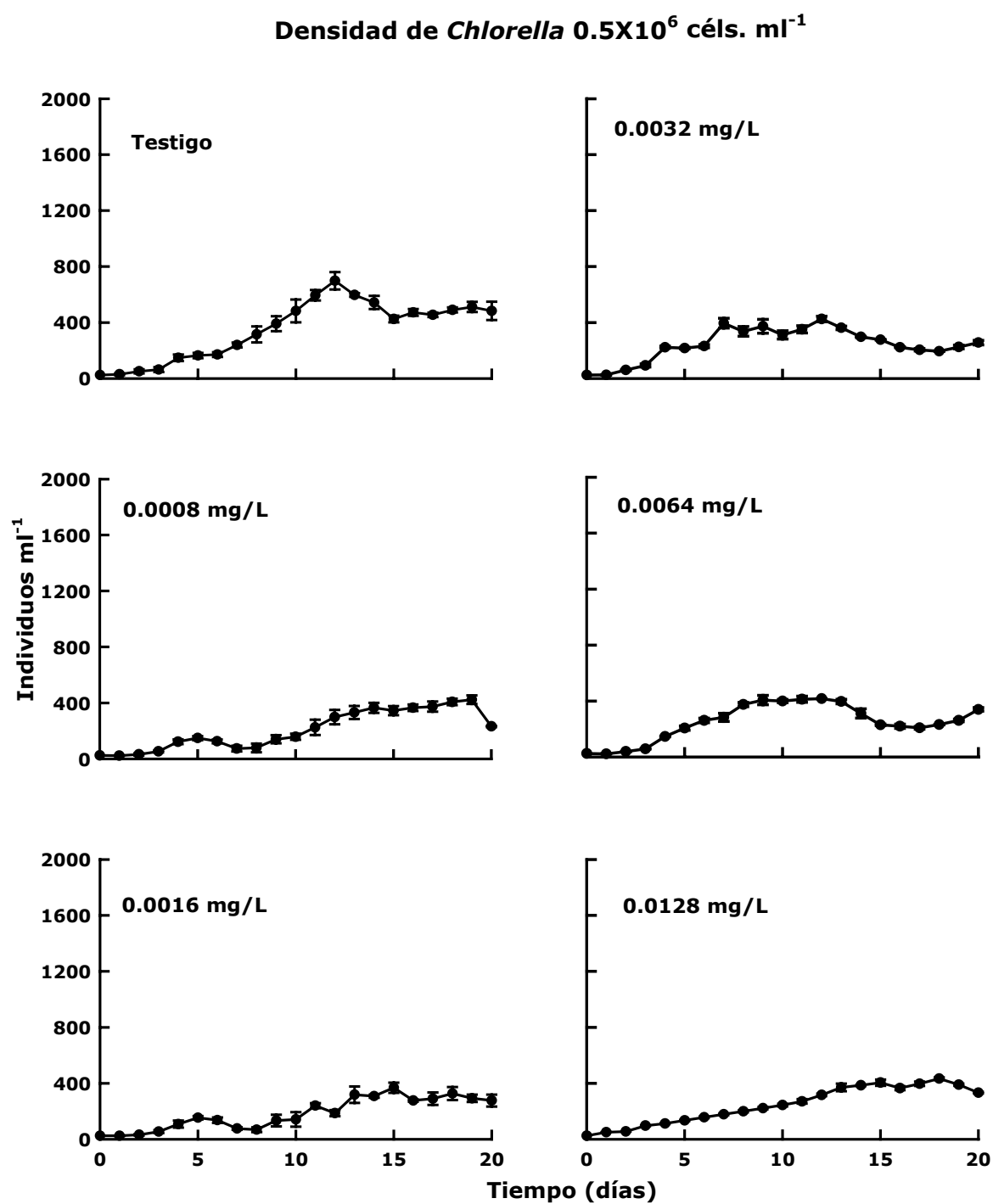


Figura 9. Curvas del crecimiento poblacional de *A. fissa*, alimentado con una densidad de *Chlorella* de  $0.5 \times 10^6$  céls  $\text{ml}^{-1}$  y bajo diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  más el testigo. Los puntos muestran los valores promedio de tres replicas  $\pm$ EE.

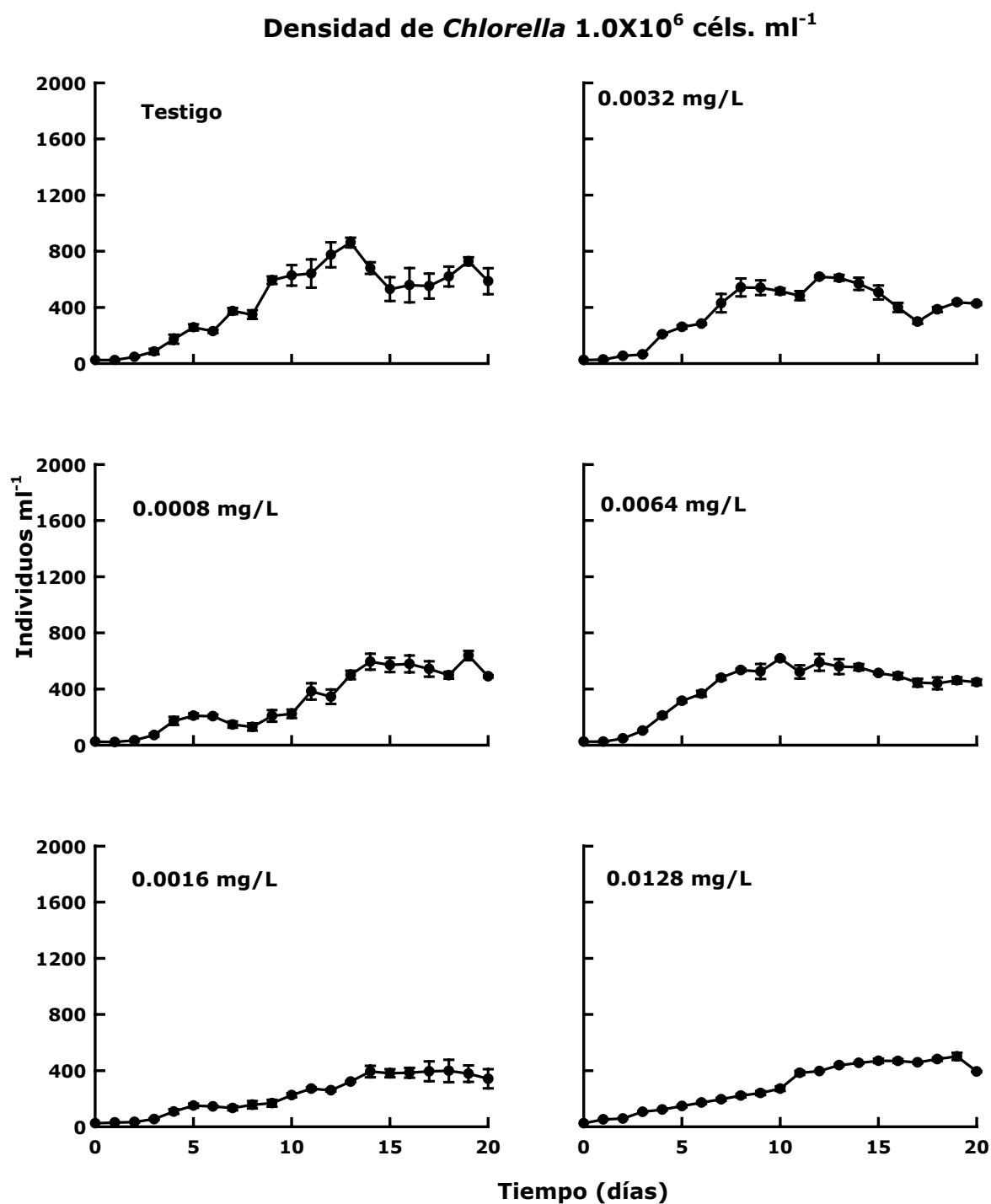


Figura 10. Curvas del crecimiento poblacional de *A. fissa*, alimentado con una densidad de *Chlorella* de  $1.0 \times 10^6$  céls  $\text{ml}^{-1}$  y bajo diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  más el testigo. Los puntos muestran los valores promedio de tres replicas  $\pm$ EE.

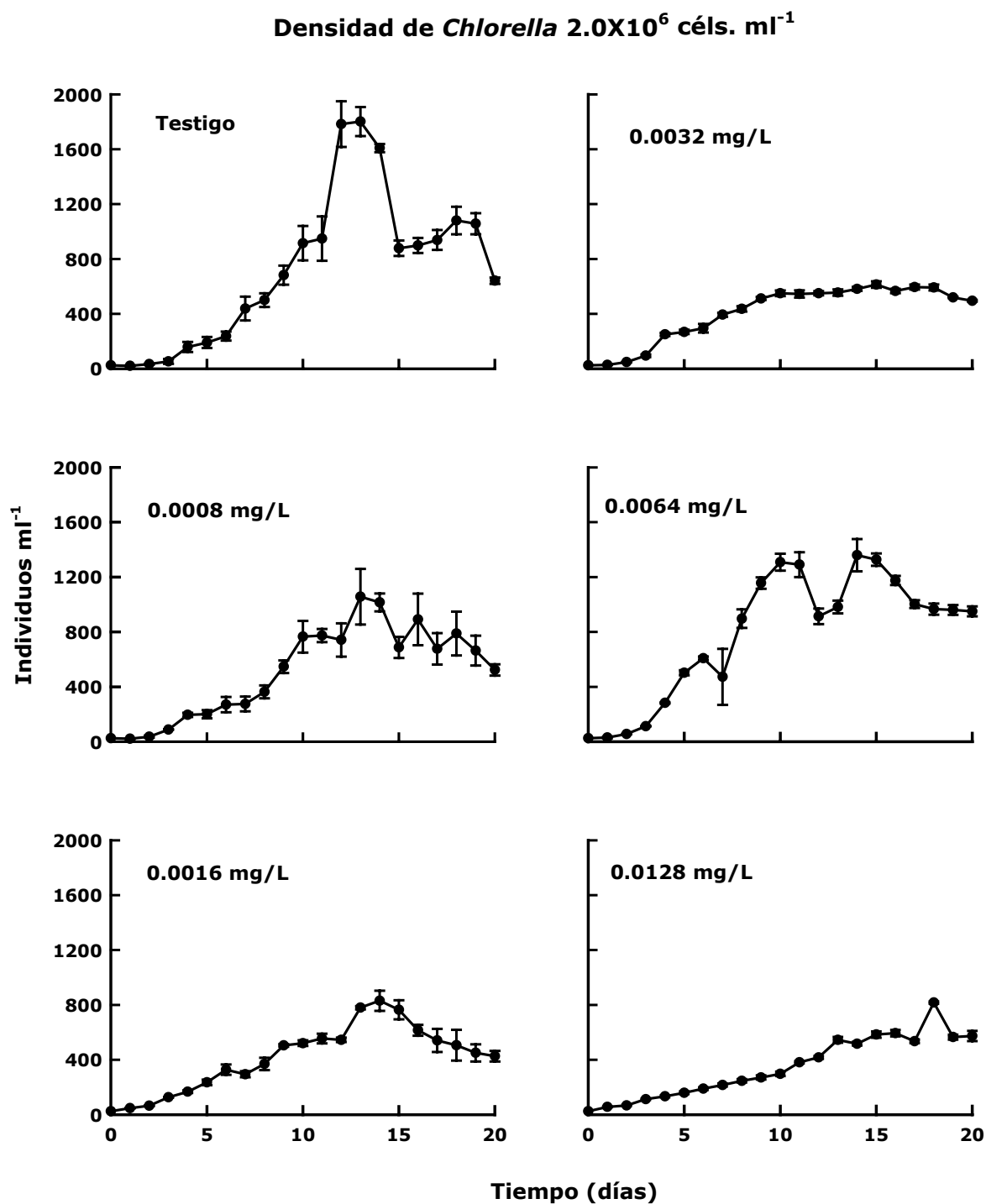


Figura 11. Curvas del crecimiento poblacional de *A. fissa*, alimentado con una densidad de *Chlorella* de  $2.0 \times 10^6$  céls  $\text{ml}^{-1}$  y bajo diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  más el testigo. Los puntos muestran los valores promedio de tres replicas  $\pm$ EE.



## 7.8. DENSIDAD MÁXIMA POBLACIONAL

En la densidad máxima (figura 13), independientemente de la concentración del tóxico, un aumento en la cantidad del alimento, tuvo como consecuencia un incremento en la densidad máxima del rotífero. En el testigo, los valores variaron entre  $780 \pm 3$  ind.  $\text{ml}^{-1}$  (baja densidad de alimento) a  $1900 \pm 48$  ind.  $\text{ml}^{-1}$  (alta densidad de alimento). En presencia del tóxico, hubo una disminución de la densidad máxima de alrededor del 40% en la baja densidad del alimento, un 30% en la densidad intermedia y un 40% en la densidad alta, con respecto al testigo. La abundancia máxima de *A. fissa* fue influenciada significativamente por la densidad del alimento, la concentración del cadmio y sus interacciones ( $p < 0.001$ , ANOVA, tabla 4). La prueba de Tukey muestra que entre los grupos 1 y 2 no hay diferencias significativas. La prueba detectó que el grupo 3 tuvo diferencias con los dos primeros grupos. Al interior de los grupos 1 y 2 son pocas las diferencias significativas; al contrario que en el interior del grupo 3, en el cual las diferencias son mayores entre los tratamientos del cadmio y del testigo (Anexo 4, tabla 11).

## 7.9. TASA DE CRECIMIENTO POBLACIONAL

La tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) (figura 14) en el testigo, mostró un incremento con el aumento en la disponibilidad del alimento, desde  $0.288 \pm 0.003$  (baja densidad del alga) hasta  $0.409 \pm 0.0222$  (alta densidad de *Chlorella*). Independiente a la densidad del alimento, un aumento en la concentración del metal, provocó una disminución en la tasa de crecimiento poblacional. En los tratamientos con el cadmio la tasa varió de  $0.1585 \pm 0.001$  (baja densidad de *Chlorella* y  $0.0128$   $\text{mg L}^{-1}$  de Cd) a  $0.275 \pm 0.007$  (alta densidad de *Chlorella* y  $0.0008$   $\text{mg L}^{-1}$  de Cd). La presencia del alga en el medio disminuyó la toxicidad del metal, ya que, a mayor densidad de alimento, mayor fue la tasa de crecimiento poblacional. La tasa de crecimiento de *A. fissa* fué influenciada significativamente por la densidad del alimento, la concentración del cadmio y sus interacciones ( $p < 0.001$ , ANOVA, tabla 4). El análisis de Tukey, muestra que entre los grupos 1 y 2 no hay diferencias significativas. El grupo 3 presentó diferencias significativas contra los grupos 1 y 2. En los grupos 2 y 3 hubo pocas diferencias entre los tratamientos, siendo más significativas las del testigo contra el resto de las concentraciones del cadmio. El grupo 1 fue el que presentó más diferencias significativas (en su interior) entre el testigo y los tratamientos con el cadmio (Anexo 4, tabla 12).

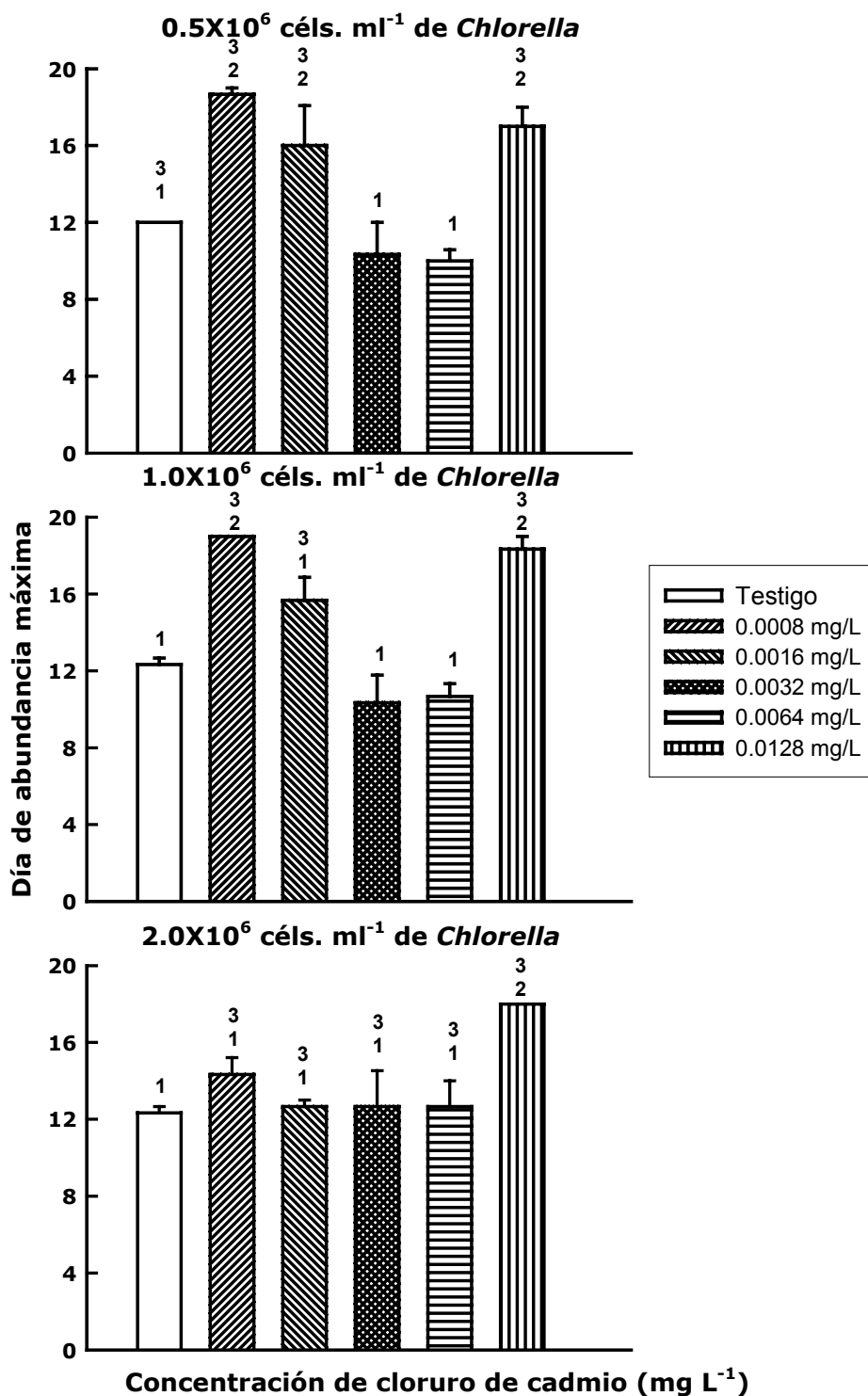


Figura 12. Gráficas del día de abundancia máxima de *A. fissa*, bajo tres densidades de *Chlorella* y cinco concentraciones de CdCl<sub>2</sub> más el testigo. Se muestran los valores promedio de tres repeticiones ±EE. Las barras con en mismo número, no tienen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

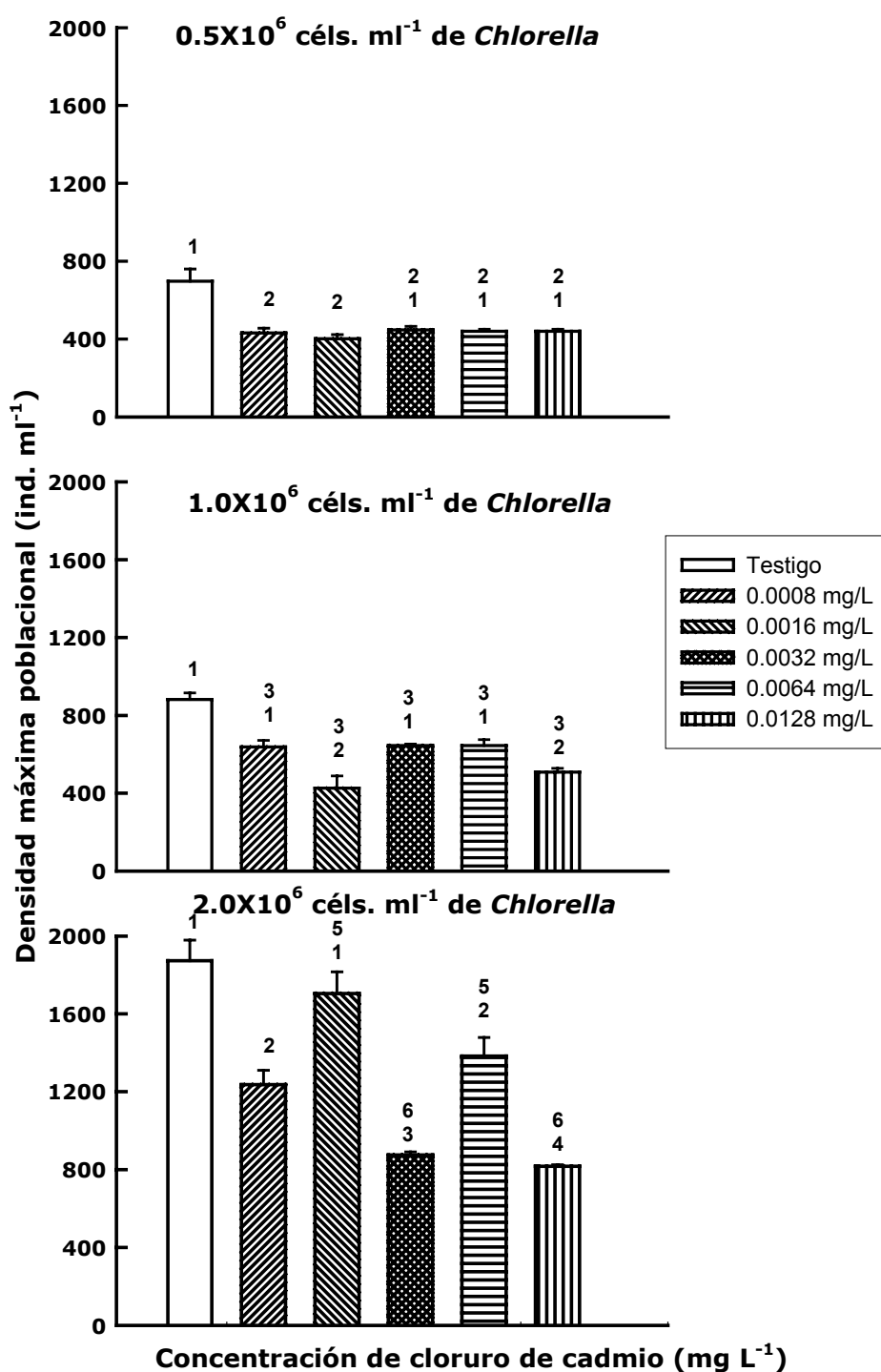


Figura 13. Gráficas de la densidad máxima de *A. fissa*, bajo tres densidades de *Chlorella* y 5 concentraciones de CdCl<sub>2</sub> más el testigo. Se muestran los valores promedio de tres repeticiones ±EE. Las barras con en mismo número, no tienen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

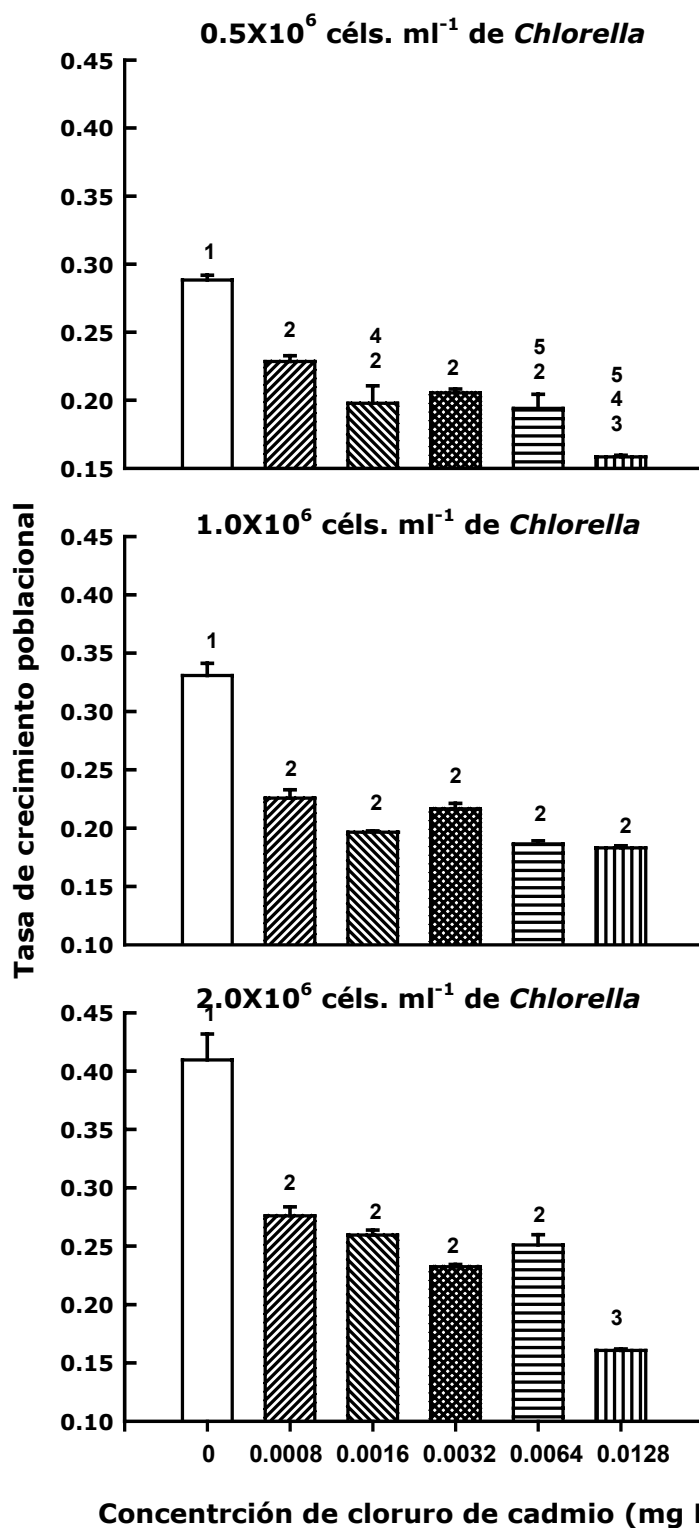


Figura 14. Gráficas de la tasa de crecimiento poblacional de *A. fissa*, bajo tres densidades de *Chlorella* y cinco concentraciones de CdCl<sub>2</sub> más el testigo. Se muestran los valores promedio de tres repeticiones  $\pm$ EE. Las barras con en mismo número, no tienen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

Tabla 4. Datos con análisis de varianza del crecimiento poblacional de *Anuraeopsis fissa* bajo la interacción de alimento (*Chlorella vulgaris* a tres densidades (0.5, 1.0 y  $2.0 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ ) y cinco concentraciones de cloruro de cadmio (0.0008, 0.0016, 0.0032, 0.0064 y  $0.0128 \text{ mg L}^{-1}$ ) mas el testigo.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>MC</b>	<b>F</b>
<b>Día de abundancia máxima.</b>				
Densidad del alga (A)	2	3.444	1.72	0.53 ns
Concentración del Cd (B)	5	412.389	82.48	24.89***
Interacción A X B	10	83.000	8.30	2.15*
Error	36	116.000	3.22	
<b>Densidad máxima.</b>				
Densidad del alga (A)	2	7425760.00	3712880.00	513.85***
Concentración del Cd (B)	5	1741396.00	348279.20	46.86***
Interacción A X B	10	1589300.00	158930.00	18.33***
Error	36	260120.00	7225.56	
<b>Tasa de crecimiento poblacional.</b>				
Densidad del alga (A)	2	0.025	0.01	67.61***
Concentración del Cd (B)	5	0.158	0.03	149.54***
Interacción A X B	10	0.017	0.00	6.95***
Error	36	0.007	0.00	

GL = Grados de libertad, SC = Suma de cuadrados, MS = Media de suma de cuadrados, F = proporción:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*),  $p > 0.05$  (ns).

## 8. DISCUSIÓN

La mayoría de los trabajos de ecotoxicología con rotíferos se han realizado utilizando especies de tamaño corporal grande (mayores a 150  $\mu\text{m}$ ), sin embargo, otras especies de importancia relevante para la comunidad acuática, no necesariamente son de un tamaño mayor. Los rotíferos de cuerpo pequeño, tienen la ventaja de poseer un tamaño poblacional mayor. *Anuraeopsis fissa*, tiene un tamaño corporal relativamente menor (50-70  $\mu\text{m}$ ), con respecto a otros géneros de la familia Brachionidae; no obstante, puede alcanzar tamaños poblacionales grandes (6000 ind.  $\text{ml}^{-1}$ ; Sarma et al., 1996). Otra ventaja que tiene, es que podemos encontrarlo en cuerpos de agua tropicales, en donde juega un papel importante en la regulación de florecimientos de bacterias y microalgas, en este sentido tiene un aporte energético importante a otros niveles tróficos, como alimento de algunos crustáceos y larvas de peces (Margalef, 1983).

La evaluación de los efectos tóxicos se lleva a cabo a nivel poblacional, ya que es más fácil detectar cambios en especies con grandes números poblacionales, que con especies de poblaciones relativamente menores. Al mismo tiempo, el crecimiento poblacional nos da la oportunidad de saber cual es la tasa de crecimiento de la población, además de que cuenta con mas de una variable sensible, como el día de abundancia máxima y la densidad máxima; ya que, a diferencia de las tablas de vida donde se utiliza una cohorte y los descendientes se van retirando, en el crecimiento poblacional, se combinan varias generaciones, de esta manera, los neonatos entran en contacto con el medio contaminado desde su nacimiento, contribuyendo así a que desarrollen algún tipo de resistencia, la cual es posible evaluar (Sarma et al., 1999).

Comparando la  $\text{CL}_{50}$  con otros trabajos y otras especies de la familia Brachionidae, podemos ver que Snell et al. (1995), registraron una  $\text{CL}_{50}$  para *Brachionus plicatilis* de 39  $\text{mg L}^{-1}$  y para *B. calyciflorus* de 1.3  $\text{mg L}^{-1}$  utilizando cadmio. En el mismo estudio encontraron para *B. plicatilis* una  $\text{CL}_{50}$  de 4.0  $\text{mg L}^{-1}$  y para *B. calyciflorus* de 4.0  $\text{mg L}^{-1}$  utilizando plomo. En el presente trabajo, la  $\text{CL}_{50}$  para *Anuraeopsis fissa*, fue de 0.449  $\text{mg L}^{-1}$  para el cadmio y de 0.726  $\text{mg L}^{-1}$  para el plomo. Así, podemos observar que *A. fissa* resultó más sensible a estos dos metales pesados, siendo menor la concentración letal media a la cual reaccionó.

Después de la evaluación de la prueba de toxicidad aguda, se pudo observar que el cadmio resultó un 40% más tóxico que el plomo. La toxicidad de estos metales pesados, se debe a que ninguno de los dos ocupa un papel en ninguna función metabólica ni fisiológica de los seres vivos (Cervantes, 1999). *A. fissa* en este estudio resultó más sensible al cadmio, ya que con una menor concentración de este metal en el medio, se presentó una mayor mortandad de los individuos de la población.

Una de las principales objeciones en la caracterización y evaluación biológica de la toxicidad acuática, producto del vertido de descargas contaminantes, radica en la variabilidad de los resultados. Es común que diferentes laboratorios analizando simultáneamente el efecto de diferentes tóxicos con organismos de una misma especie, obtengan estimaciones de la Concentración Letal Media de una magnitud de diferencia del 150% (Weber, 1991). Estas variaciones pueden deberse a varios factores, entre los cuales pueden ser: la salud de los organismos de prueba, las diferencias entre las camadas, la tolerancia genética a los tóxicos y cambios en la calidad del agua. (Acevedo, 2003).

En el crecimiento poblacional para ambos metales, en la densidad de alimento de  $0.5 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$  y en cualquier concentración de los tóxicos, el comportamiento fue similar; ya que no existió una reproducción rápida y no se alcanzó una alta densidad poblacional, esto debido tal vez a que, al estar en contacto con el tóxico, la población se encuentra en estrés y posiblemente ocupa más energía para contrarrestarlo que para aspectos reproductivos, por lo que no puede aumentar su densidad. Además al no contar con suficiente alimento en el medio, la población no puede recuperarse. En el caso de los individuos alimentados con una densidad de *Chlorella* de  $2.0 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$  y en las cuatro primeras concentraciones de los tóxicos, existe una reproducción rápida, alcanzando densidades poblacionales más aceptables, como las reportadas en otros estudios (Dumont et al., 1995). Esto se debe a que con una mayor presencia de *Chlorella* en el medio, el tóxico se encuentra menos disponible, debido a que las células de la microalga, son capaces de fijar moléculas de los metales pesados (Travieso, 1999). Además con una mayor densidad de alimento, los individuos tienen una mayor asimilación de nutrimentos y una mayor resistencia (un mejor estado fisiológico) a los efectos de los tóxicos. Como ya fue mencionado, las algas también tienen la capacidad de reducir los efectos de los metales pesados, pero, hasta ciertas concentraciones de

los metales (las concentraciones más altas  $-0.1024 \text{ mg L}^{-1}$  para el plomo y  $0.0128 \text{ mg L}^{-1}$  para el cadmio-), la densidad más alta de *Chlorella* no fue capaz de reducir el efecto tóxico de estos, además, de que los individuos expuestos a estos tratamientos pudieron estar tan intoxicados por los metales, que se vio afectada su capacidad de filtración, entre otros aspectos (Dodson y Frey, 1991.).

Al igual que en otros trabajos, en el presente, se vio de manera muy clara como ocurrió un incremento en las densidades poblacionales de *A. fissa* al mismo tiempo que se incrementaba la densidad del alimento (*Chlorella*) en el medio, esto se debe a que, al haber una mayor disponibilidad de este para los rotíferos es más fácil acceder a él, sin la necesidad de desplazarse demasiado para poder conseguirlo. Como puede ocurrir en los cuerpos de agua donde la cantidad de alimento es limitada, los rotíferos tienen que emplear reservas energéticas para desplazarse y buscar su comida, sacrificando en algunos casos la energía destinada para el crecimiento individual y/o poblacional o incluso el aspecto reproductivo. Lo cual fue discutido recientemente (Sarma et al., 2002).

Por otro lado, se pudo observar de una manera general, que las concentraciones de los metales pesados tuvieron un efecto negativo sobre las variables del crecimiento poblacional en la mayoría de los casos, esto es fácilmente comparable con los resultados de las densidades máximas y los días de abundancia máxima (figuras 6, 7, 12 y 13), ya que, de no haber tenido algún efecto sobre estas variables, el comportamiento en todos los tratamientos hubiese sido similar, registrando valores muy semejantes. Estas diferencias también se pudieron observar estadísticamente con la prueba de ANOVA de dos vías aplicada (tabla 4 y 5) y más específicamente con la prueba de Tukey, para detectar las diferencias altamente significativas (anexo 4, tablas 7-12)

Es importante señalar que una de las principales rutas de entrada de compuestos tóxicos a los organismos, es por absorción a nivel del tracto digestivo (Acevedo, 2003). La incorporación de los metales pesados en los organismos acuáticos, se relaciona con la fisicoquímica del metal y por ende con su biodisponibilidad, donde las respuestas y la condición fisiológica particular del organismo, pueden interactuar modificando las variables a evaluar en el crecimiento poblacional (Zúñiga, 2002).



El tamaño corporal de *A. fissa*, le permite alcanzar números poblacionales mayores que otros géneros de la familia Brachionidae, poblaciones de hasta 6000 ind. ml<sup>-1</sup> (Sarma et al., 1996), esto se debe a que existe una relación inversamente proporcional entre el número poblacional y el tamaño del cuerpo, si el organismo tiene una talla pequeña alcanza grandes números poblacionales, pero si su cuerpo es más grande su tamaño poblacional será menor (Nandini y Sarma 2000). Esto como ya se mencionó, es una ventaja para poder evaluar fácilmente los impactos sobre la población del rotífero. En este trabajo se obtuvo una densidad máxima de *A. fissa* de 2165±48 ind. ml<sup>-1</sup> con una densidad de *Chlorella vulgaris* de 2.0X10<sup>6</sup> céls. ml<sup>-1</sup>, muy semejante a la reportada por Dumont et al. (1995) para la misma especie, donde la densidad máxima fue de 2312 ind. ml<sup>-1</sup>, alimentada con *Scenedesmus obliquus*. De acuerdo con esto *A. fissa* alcanza tamaños poblacionales similares, aun cuando es alimentado con diferentes tipos de microalgas.

La densidad de *Chlorella*, ayudó a disminuir el efecto tóxico de los metales. La densidad del alga tuvo un efecto de destoxificación, esto debido posiblemente a los procesos de adhesión y absorción que se han reportado para esta alga (Cervantes, 1999; Sarma et al., 2001). La adhesión ocurre a nivel de la pared celular, en donde los iones metálicos son atraídos. La absorción también ocurre por la pared de la célula, aquí los iones son incorporados al interior del alga, con esto se pierde parte de su toxicidad. Una vez que el medio se estabiliza (no hay movimiento), las algas tienden a sedimentarse llevándose consigo al fondo importantes cantidades de los metales, quedando así una menor cantidad de estos en suspensión. Este fenómeno se ve magnificado cuando en el medio se encuentra una mayor cantidad de *Chlorella*, ya que, a mayor densidad de esta, la absorción y la adhesión se ven incrementadas, ayudando a una disminución mas acelerada de los metales. Altas densidades de las microalgas ayudan a eliminar gran cantidad de los metales pesados a través de la destoxificación del medio (Sarma et al., 2002).

Los datos obtenidos indican que, la densidad de 2.0 X10<sup>6</sup> céls. ml<sup>-1</sup> de *C. vulgaris* tuvo el mayor efecto destoxificante de los metales pesados sobre las variables poblacionales de *A. fissa* (densidad máxima y la tasa de crecimiento poblacional). Esto, debido a que el suministro de alimento, es un factor importante que influye en la respuesta de los organismos a los tóxicos, durante las pruebas agudas y

crónicas, debido a que la concentración del alga juega un papel importante en las pruebas de ecotoxicología. Se reporta que si se les suministra la concentración adecuada de alimento, puede contribuir a que los organismos presenten una mayor resistencia a los efectos de los agentes tóxicos (Martínez, 1994).

Comparando la tasa de crecimiento poblacional con otros trabajos realizados con la misma especie del rotífero (*A. fissa*) se puede observar que la tasa alcanzada con *Chlorella* en este trabajo, fue menor en comparación con otros trabajos en donde el alimento consistió en especies del género *Scenedesmus*. Haciendo una comparación de la tasa de crecimiento poblacional de *A. fissa* con especies del género *Brachionus* (anexo 3, tabla 6), resulta mas que evidente la diferencia en cuanto a los valores obtenidos, incluso alimentadas con el mismo tipo de alga. Hay pocos trabajos publicados sobre el tamaño de una especie de rotífero y su tasa de crecimiento poblacional, en estos se describe que aparentemente existe una relación directa entre ellos. Generalmente especies grandes como *Asplanchna* y *Brachionus calyciflorus*, tienen altas tasas de crecimiento poblacional (alrededor de  $1.0 \text{ día}^{-1}$ ; Sarma et al., 1996), a comparación de especies pequeñas como *Anuraeopsis* (de  $0.3$  a  $0.8 \text{ día}^{-1}$ ; Dumont, et al., 1995) y *Lepadella* (alrededor de  $0.5 \text{ día}^{-1}$ ; Sarma y Nandini, 2002). La tasa de crecimiento poblacional, es la variable con la cual se pudo detectar la mayor sensibilidad a los efectos tóxicos de los metales. Sin duda, esta variable es con la cual resulta mas apropiado evaluar los efectos tóxicos sobre las especies de rotíferos, ya que esta nos refiere como se esta reproduciendo determinada población (Xi y Hu, 2003).

En varios trabajos de ecotoxicología del zooplancton, se han empleado diferentes tipos de alimento como *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Ankistrodesmus*. El papel de la concentración del alimento puede variar dependiendo del nivel de tolerancia de cada especie del zooplancton. Generalmente los rotíferos toleran mayores concentraciones de microalga que los cladóceros (Nandini y Sarma, 2000), por ejemplo Sarma et al. (1996), cultivó *Brachionus calyciflorus* utilizando *Scenedesmus acutus* a una densidad de  $40.5 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ , sin un efecto inhibitorio. En este trabajo se usaron densidades entre  $0.5$  y  $2.0 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ; el rango de las concentraciones de alimento empleadas en este estudio fueron similares a las utilizadas en estudios previos (Sarma, 2002).

En términos económicos, los productos derivados de la acuicultura, dependen mucho del ahorro y eficacia con la que esta se lleve a cabo. En este sentido cualquier tóxico que afecte al rotífero, afecta la producción del alimento vivo. Aunque *A. fissa* no ha sido probado como alimento de larvas de peces comerciales o comestibles, no puede descartarse, ya que considerando su pequeño tamaño y la ausencia de mecanismos de defensa (además de ser planctónico), puede ser un organismo excelente como alimento vivo para las larvas de peces de ornato, las cuales generalmente presentan una boca pequeña. Esto, tomando en cuenta los grandes números poblacionales que *A. fissa* alcanzó en este estudio y en otros reportados (Dumont et al., 1995)

Aunque este trabajo indica que *Anuraeopsis fissa* es más sensible a ambos metales pesados que otros rotíferos (*Brachionus calyciflorus* y *B. plicatilis*), el uso de esta especie en lugar de *B. calyciflorus* y/o *D. magna* para evaluar la calidad de los cuerpos de agua aun no puede ser llevada a cabo, ya que se necesita obtener mayor información básica sobre la capacidad que tiene esta especie a tolerar otros tóxicos con diferentes tipos de microalgas.

## 9. CONCLUSIONES

- ❖ Los valores obtenidos en la  $CL_{50}$  de los tóxicos evaluados (de  $0.726 \text{ mg L}^{-1}$  para el plomo y de  $0.449 \text{ mg L}^{-1}$  para el cadmio), muestran que *A. fissa* es más sensible a estos metales que otras especies de la misma familia (Brachionidae).
- ❖ De los dos metales evaluados en las pruebas de toxicidad aguda, el cadmio resultó un 40% más tóxico que el plomo.
- ❖ Los resultados de las pruebas de toxicidad crónica, indican que concentraciones muy bajas de metales pesados ( $0.0008 \text{ mg L}^{-1}$  de cadmio y  $0.0064 \text{ mg L}^{-1}$  de plomo) no tienen mucho efecto sobre el crecimiento poblacional del rotífero.
- ❖ La alta densidad poblacional de *A. fissa*, permite evaluar cambios en las variables poblacionales del rotífero en los cuerpos de agua afectados por metales pesados.
- ❖ *Chlorella vulgaris*, en altas densidades disminuyó la toxicidad del cadmio y del plomo, sin embargo hasta cierta concentración del metal ( $0.1024 \text{ mg L}^{-1}$  para plomo y  $0.0128 \text{ mg L}^{-1}$  para cadmio), el alga ya no puede disminuir el efecto tóxico de los metales en el medio.
- ❖ Aunque los resultados mostraron que *A. fissa* es más sensible al plomo y al cadmio que otros rotíferos, aun faltan por realizarse mas pruebas y obtener mas datos para tomar en cuenta a este organismo en las evaluaciones ambientales.

## 10. REFERENCIAS

- Acevedo, C. A. 2003. Determinación de la concentración letal media en *Daphnia magna* STRAUS (CLADOCERA-CRUSTACEA), utilizando tóxicos de referencia. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Alcocer, J. y Sarma, S.S.S. 2002. Preface. *Hydrobiology* 467: page VII.
- Anónimo. 1985. Methods of measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. US. Environment Protection Agency EPA/600/4-85/013.
- Barnes, R. D. 1989. Zoología de los invertebrados. 5ª edición. Nueva editorial interamericana. México. 261-270 p.
- Barth, R. 1982. The invertebrate world. Sounders College Publishing. United States of America. 173-178 p.
- Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L. J. 1988. Micro-algal biotechnology. Cambridge University. London. 477 p.
- Buikema, A. L., Niederlehner, B. R. y Cairns, J. 1982. Biological monitoring. Part IV-Toxicity testing. *Water. Res.* 16:239-262.
- Cañizares-Villanueva, R. O., Martínez-Jeronimo, F. F. Y Espinosa, C. 1999. Acute toxicity to *Daphnia magna* of effluents containing Cd, Zn and mixture Cd-Zn after removal by *Chlorella vulgaris*. *Environ. Toxicol Chem.* 15:160-164.
- Cervantes, C., Moreno-Sánchez, R. 1999. Contaminación ambiental por metales pesados: impacto en los seres vivos. AGT Editor, S.A., 157 p.
- Dodson, S. I. y Frey, D. G. 1991. Cladocera and other branchiopoda.. In Thorp, J.H. & A.P. Covich (eds). Ecology and classification of North American Freshwater Invertebrates. Academic Press, London. 850-914 p.
- Dumont, H. J., Sarma, S.S.S., Jawahar, A. 1995. Laboratory studies on the population dynamics of *Anuraeopsis fissa* (Rotifera) in relation to food density. *Freshwater Biology.* 33: 39-46.
- Finney, D. J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, 3rd edn. London. 333 p.
- Flores, V. A. 1999. Estudio del genero *Scenedesmus* Meyen 1892 en algunos cuerpos de agua del altiplano Mexicano y su posible uso como indicador de la calidad del agua. Tesis de licenciatura, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Forbes, V. E., Calow, P. 1999. Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology?. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1544-1556.
- Frank, E., Guthrie y Perry. 1980. Introduction to environmental toxicology. Detection. Bioassay Gary M. Rand. De. Elsevier. New York. 390-401 p.
- Gama-Flores, J. L., Sarma, S. S. S., Fernández-Araiza, M. A. 1999. Combined effects of *Chlorella* density and methyl parathion concentration on the population growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 62:769-775.
- González, M., Silva, E., Schalscha, F. Alay. 1998. Cadmium and lead in a trofic marine Chain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60:112-118.
- Hodgson, E. V. y Dauteman, W. C. 1980. Metabolism of toxicants. Phase I reactions. In: Introduction to biochemical toxicology. Eds. E. Hodgson y F. E. Guthrie. New York: Elsevier. 113-118 p.
- Hutchinson, G.E., 1967. A treatise on limnology. Introduction to the lake biology and the limnoplankton. Vol. 2, John Wiley & Sons. New York. 1115 p.
- Iyer, N. y Rao, T. R. 1993. Effect of the epizoic rotifer *Brachionus rubens* on the population growth of three cladoceran species. *Hydrobiology* 255/256: 325-332.
- Kopplin, M. 2001. Toxicología ambiental. Evaluación de riesgos y restauración ambiental. Universidad de Arizona, USA.
- Koste, W. 1978. Rotatoria. Gebrüder Borntraeger. Stuttgart, Berlin. 130 p.
- Krebs, C. J. 1985. Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance. Harper and Row. New York. 789 p.
- Landis, W. G. and Yu, M. 1999. Introduction to environmental toxicology: Impacts of chemicals upon ecological systems. 2nd Edition. CRC Press (Lewis Publishers). 390 p.
- Lutz, P. 1986. Invertebrate zoology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. United States of America. 212-217 p.
- Margalef, R., 1983. Limnología. Ed. Omega. Barcelona, España. 1010 p.
- Marshall, A. 1980. Zoología de invertebrados. Reverté. Barcelona, España 298-305 p.
- Martínez, F., Villaseñor, R. G. y Espinoza, F. 1994. Effect of food type and concentration on the survival longevity, and reproduction of *Daphnia magna*. *Hidrobiología*. 282: 207-214.

- Meglitsch, P. 1978. Invertebrate zoology. Oxford University Press. United States of America. 216-226 p.
- Nandini, S. y Sarma, S.S.S. 2000. Life table demography of four cladoceran species in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) density. *Hidrobiología*. 435: 117-126.
- Nandini, S. y Sarma, S.S.S. 2002. Competition between the rotifers *Brachionus patulus* and *Euchlanis dilatata*: effect of algal food concentration and relative initial densities of competing species. *Russian Journal of Ecology* 33(4): 291-295.
- Nelson, S. y Roline, R. 1998. Evaluation of the sensitivity of rapid toxicity test relative to Daphnid acute lethality test. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 292-299.
- Nogrady, T., Wallace, R. L. y Snell, T. W. 1993. Rotifera 1. Biology, ecology and systematics. SPB Academic Publishing by The Hague.
- Okauchi, M. y Fukusho, K. 1984. Food value of minute alga, *Tetraselmis tetrahele* for the rotifer *Brachionus plicatilis* culture: 1. Population growth with bath culture. *Bull. Nat. Res. Inst. Aquacult.* 5:13-18.
- Ooms-Wilmis, A. L. 1997. Are bacteria an important food source for rotifers in eutrophic lakes?. *J. Plankton Res.* 19:1125-1141.
- Ooms-Wilms, A. L., Postema, G. y Gulati, R. D. 1991. First attempt to measure the clearance rate of *Anuraeopsis fissa*. En: Ooms-Wilms, A. L. 1998. On the food uptake and population dynamics of rotifers in a shallow eutrophic lake. *Academisch Proefschrift*. Netherlands. 15-20 p.
- Pickardt, P. C. y Carol, L. 2002. Algal blooms reduce the uptake of toxic methyl mercury in freshwater food webs. *Ecology*. 99. No. 7. 4419-4423.
- Pechenik, J. 1991. Biology of invertebrates. Wm. C. Brown Publishers. United States of America. 197-203 p.
- Peña, A. F. 2003. Crecimiento poblacional de tres rotíferos y dos cladóceros planctónicos en relación con el tipo de dieta. Tesis de maestría. UNAM Posgrado en ciencias del mar y limnología. México D. F.
- Persson, P. 1978. La contaminación de las aguas continentales. Ediciones Mundi-Prensa, España. 326 p.
- Rand, G. M. y Petrocelli, S. R. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology. Copyright. USA. 666 p.
- Rosales-Hoz, L., Carranza-Edwards, A. 1998. Heavy metals in sediments from Coatzacoalcos River, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 553-561.

- Rothhaupt, K. O. 1990. Population growth rates of two closely related rotifer species: effect of food quantity, particle size and nutritional quality. *Freshwater Biol.* 23:561-570.
- Rusell-Hunter, W. 1979. A life of vertebrates. Macmillan Publishing Co., Inc. New York. 160-161 p.
- Sarma, S.S.S. 1991. Rotifers and aquaculture (Review). *Environ. Ecology.* 9: 414-428.
- Sarma, S.S.S. 2000. The use of rotifers for ecotoxicological studies in Mexico. En: Ríos-Jara, E., Juárez-Carrillo, M., Pérez-Peña, E., López-Uriarte, E. G., Robles-Jarero, J. D., Hernández-Becerril y Silvia-Briano M. (eds). Estudios sobre plancton en México y el Caribe. Sociedad Mexicana Planctología / Universidad de Guadalajara (México). 8-11 p.
- Sarma, S.S.S., Fernández-Araiza, M.A. y Nandini, S. 1999. Competition between *Brachionus calyciflorus* Pallas and *Brachionus patulus* (Müller) (Rotifera) in relation to algal food concentration and initial population density. *Aquatic Ecology.* 33(4): 339-345.
- Sarma, S.S.S., Iyer, N. y Dumont, H. J. 1996. Competitive interactions between herbivorous rotifers: importance of food concentration and initial population density. *Hidrobiología.* 331: 1-7.
- Sarma, S.S.S. y Nandini, S. 2002. Comparative life table and population growth of *Brachionus macracanthus* DADAY, 1905 and *Platylabus quadricornis* EHRENBERG, 1832 (Rotifera, Brachionidae) in relation to algal (*Chlorella vulgaris*) food density. *Acta hidrichem. Hydrobiol.* 30:128-140.
- Sarma, S.S.S., Larios, J. P. F., Nandini, S. 2001. Effect of three food types on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *B. patulus* (Rotifera: Brachionidae). *International Journal of Tropical Biology and Conservation.* 49(1): 77-84.
- Sarma, S.S.S., Mangas-Ramírez, E. y S. Nandini. 2003. Effect of ammonia toxicity on the competition among three species of cladocerans (Crustacea:Cladocera). *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 55:227-235.
- Sarma, S.S.S., Nandini, S., Ramirez-Perez, T. 2001., Combined effects of mercury and algal food density on the population dynamics of *Brachionus patulus* (Rotifera). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67:841-847.
- Sarma, S.S.S., Nandini, S., Gama-Flores, J. L. y Fernández-Araiza, M. A. 2001. Population growth *Euchlanis dilatata* (Rotifera): combined effects of methyl



- parathion and food (*Chlorella vulgaris*). *J. Environ. SCI. Health*, B36(1): 43-54.
- Sarma, S.S.S., Ramirez, P.T. y Nandini, S. 2000. Comparison of the sensitivity of *Brachionus calyciflorus* and *B. patulus* (rotifera) to selected heavy metals under low and high food (*Chlorella vulgaris*) levels. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64: 735-739.
- Sarma, S.S.S. y Rao, T. R. 1990. Population dynamics of *Brachionus patulus* Muller (Rotifera) in relation to food and temperature. *Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.)* 99: 335-343.
- Sarma, S.S.S. y Rao, T. R. 1991. The combined effects of food and temperature on the life history parameters of *Brachionus patulus* Muller (Rotifera). *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 76: 225-239.
- Seoanez, C. M. 1995. Ingeniería medioambiental aplicada a la industria y empresas. Manual para responsables medioambientales. Colección ecológica industrial. Grupo Mundi-Presa. Madrid, España. 163-165 p.
- Snell, T. W. y Janssen, C. 1995. Rotifers in ecotoxicology: a review. *Hydrobiology*. 313/314: 231-247.
- Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. 1981. Biometry. W.H Freeman and Company. 807 p.
- Travieso, L. Cañizares, O., Borja, F., Benitez, A., Dominguez, R., Dupeytrón, R. y Valiente, V. 1999. Heavy metal removal by microalgae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62: 144-151.
- Turk, A. 1973. Ecología-contaminación-medio ambiente. Interamericana, México. P. 227 p.
- Vanegas, C., Espina, S., Botello, A. V. y Villanueva, S. 1997. Acute toxicity and synergism of cadmium and zinc in white shrimp, *Penaeus setiferus* juveniles. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58: 87-92.
- Vilaclara, G. y Sládeček, 1989. Mexican rotifers as indicators of water quality with description of *Collotheca riverain*. *Sp. Arch. Hydrobiol.* 115:257-263.
- Villanueva, F. S. y Botello A. V. 1998. Pollution by metals in coastal areas of Mexico. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 157:53-94.
- Vizcaíno, M. F. 1986. La contaminación en México. Fondo de Cultura Económica, México. 77-80, 205, 237 p.
- Wang, J. y Li, D. 1997. Comparative studies on principal parameters of population growth of live freshwater rotifers. *Acta Hydrobiol. Sin.* 21:131-136.
- Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M. y Peakall, D. B. 1998. Principles of ecotoxicology. Taylor and Francis, Gran Bretaña. 321 p.

- Wallace, R. L. y Snell, T. W. 1991. Rotifera. Editado por James H. Trop y Alan. Academic Press Inc.
- Waltz, N. 1993. Carbon metabolism and population dynamics of *Brachionus angularis* and *Keratella chochlearis*. In: N. Waltz (ed). Plankton regulation dynamics. Experiments and models in rotifer continuous cultures. Springer-Verlag. Berlin. 89-105 p.
- Weber, C. I. 1991. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwaters and marine organisms. Ath Ed. USEPA, Cincinnati, Ohio, EPA 600 4-90 027. 197 p.
- Whitten, K. W., Gailey, K. D. y Davis, R. E. 1992. Química general. Mc Graw-Hill Interamericana, México. 884 p.
- Williamson, C. E. y Reid, J. W. 2001. Copepoda. In Thorp, J. H. & A. Covich (eds) Ecology and classification of North American Freshwater Invertebrates. Second Edition, Academic Press. San Diego: 787-822 p.
- Xi, L. Y. y Hu, Y. 2003. Effect of Thriophanate-Methyl on the reproduction and survival of the Freshwater Rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71:722-728.
- Zúñiga, L. S. 2002. Efecto del cadmio en la osmorregulación de juveniles de *Litopenaeus setiferus* (Crustácea-Decapoda). Tesis de Maestría, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. 104 p.

## 11. ANEXOS

### ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO

#### MEDIO DE CULTIVO PARA MICROALGAS (BOLD BASAL)

(Borowitzka y Borowitzka, 1988)

1. Nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ )	250 g/l
2. Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	75 g/l
3. Fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	75 g/l
4. Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	75 g/l
5. Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )	25 g/l
6. EDTA	50 g + 31 g KOH/l
7. Sulfato de hierro ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	4.89 g + 1 ml $\text{H}_2\text{SO}_4$
8. Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	11.42 g/l
9. Elementos traza:	
• Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	1.44 g/l
• Trióxido de molibdeno ( $\text{MoO}_3$ )	0.71 g/l
• Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ )	1.75 g/l
• Nitrato de cobalto ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ )	0.49 g/l
• Sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ )	8.82 g/l

Por cada litro de agua destilada se agregan 1.5 ml de cada solución. Cabe mencionar que es preferible que los elementos se agreguen en orden ascendente. La solución resultante tiene un color azul claro, lo que indica que la mezcla fue hecha correctamente.

#### MEDIO DE CULTIVO PARA ZOOPLANCTON (EPA)

(Anónimo, 1985)

1. Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )	96 mg/l
2. Sulfato de calcio ( $\text{CaSO}_4$ )	60 mg/l
3. Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ )	60 mg/l
4. Cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ )	4 mg/l

Todo lo anterior se disuelve en un litro de agua destilada.

### ANEXO 3. METODO PROBIT

1. El valor probit empírico se obtuvo en la siguiente tabla 5 (Finney, 1971), a partir del % de mortalidad por concentración del tóxico.

Tabla 5. Relación entre porcentaje de mortalidad y valores probit empíricos.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
%	0.00	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90
99*	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

\* valores entre 99.0 y 99.9

2. Las concentraciones del tóxico se convirtieron a  $\log_{10}$ .
3. Se graficaron los valores de los pasos 1 y 2, siendo considerados los valores probit empíricos en el eje "Y" y las concentraciones del tóxico convertidas en el eje "X".
4. Se hizo una regresión lineal.
5. Se hizo una intersección en el punto intermedio del valor probit hacia la línea trazada y se llevó hacia las concentraciones del metal.

## ANEXO 3. TABLA DE r.

Tabla 6. Tasa de crecimiento poblacional (r) por día de especies seleccionadas de rotíferos de la familia Brachionidae. Modificado de Sarma et al. (2001).

	Experi- mento	Tipo de alimento	Densidad del alimento	Valor de r	Referencia
<b>Anuraeopsis fissa</b>	C. P.	<i>Scenedesmus obliquus</i>	$0.5-8 \times 10^6$ céls ml <sup>-1</sup>	0.45-0.86	Dumont, et al., 1995
	C. P.	<i>Scenedesmus acutus</i>	$0.5-40.5 \times 10^6$ céls ml <sup>-1</sup>	0.44-0.88	Sarma et al., 1996
	T. V.	-	-	0.10	Ooms-Wilmis, 1997
	C. P.	<i>Chlorella vulgaris</i>	$0.5 \times 10^6$ céls ml <sup>-1</sup>	<b>0.315</b>	<b>Presente trabajo, 2004</b>
	C. P.	<i>Chlorella vulgaris</i>	$1.0 \times 10^6$ céls ml <sup>-1</sup>	<b>0.356</b>	<b>Presente trabajo, 2004</b>
C. P.	<i>Chlorella vulgaris</i>	$2.0 \times 10^6$ céls ml <sup>-1</sup>	<b>0.408</b>	<b>Presente trabajo, 2004</b>	
<b>Brachionus angularis</b>	C. P.	<i>Stichococcus basillaris</i>	-	0.58	Walz, 1993
<b>B. calyciflorus</b>	T. V.	-	-	2.20	Wang y Li, 1997
	C. P.	<i>Scenedesmus acutus</i>	-	0.79-1.49	Sarma, et al., 1996
	C. P.	Varios tipos de algas	-	0.80	Rothhaupt, 1990
<b>B. macracanthus</b>	C. P.	<i>Chlorella</i>	$0.25 \times 10^6$ céls ml <sup>-1</sup>	0.41	Sarma y Nandini, 2002
	C. P.	<i>Chlorella</i>	$0.5 \times 10^6$ céls ml <sup>-1</sup>	0.52	
	C. P.	<i>Chlorella</i>	$1.0 \times 10^6$ céls ml <sup>-1</sup>	0.45	
	C. P.	<i>Chlorella</i>	$2.0 \times 10^6$ céls ml <sup>-1</sup>	0.48	
	C. P.	<i>Chlorella</i>	$4.0 \times 10^6$ céls ml <sup>-1</sup>	0.43	
<b>B. patulus</b>	C. P.	<i>Chlorella</i>	$1-4 \times 10^6$ céls ml <sup>-1</sup>	0.14-0.61	Sarma y Rao, 1991
	T. V.	<i>Chlorella</i>	$1-3 \times 10^6$ céls ml <sup>-1</sup>	0.12-0.24	Sarma y Rao, 1990
<b>B. plicatilis</b>	C. P.	<i>Tetrathelmis tetrathele</i>	$0.05 \times 10^6$ céls ml <sup>-1</sup>	0.24-0.49	Okauchi y Fukusho, 1984
	C. P.	<i>Chlorella</i>	$1.5 \times 10^6$ céls ml <sup>-1</sup>	0.16-0.47	Okauchi y Fukusho, 1984
<b>B. rubens</b>	C. P.	Varios tipos de algas	-	0.80	Rothhaupt, 1990
	C. P.	<i>Chlorella</i>	$3 \times 10^6$ céls ml <sup>-1</sup>	0.79	Iyer y Rao, 1993
<b>B. urceolaris</b>	T. V.	-	-	1.32	Wang y Li, 1997

El método de cálculo de la r, depende de los datos y de las condiciones de cultivo. Los valores negativos de r, son consecuencia del estrés y no están incluidos. C.P.= Crecimiento poblacional y T.V.= Tabla de vida.

**ANEXO 4. PRUEBA DE TUKEY.**

Tabla 7. Prueba de Tukey para el día de densidad máxima con las densidades 1, 2 y 3 de *Chlorella* y seis concentraciones del cloruro de plomo. Las diferencias significativas se observan en negritas.

	{0} 18.667	{1} 20.000	{2} 17.000	{3} 16.000	{4} 19.000	{5} 19.333
1 {0}						
1 {1}	0.995541					
1 {2}	0.961259	0.252307				
1 {3}	0.435912	<b>0.026875</b>	0.999861			
1 {4}	1.000000	0.999861	0.850402	0.252307		
1 {5}	1.000000	1.000000	0.656322	0.130149	1.000000	
	{0} 18.667	{1} 18.000	{2} 16.000	{3} 15.333	{4} 15.000	{5} 16.333
2 {0}						
2 {1}	1.000000					
2 {2}	0.435912	0.850402				
2 {3}	0.130149	0.435912	1.000000			
2 {4}	0.061235	0.252307	0.999861	1.000000		
2 {5}	0.656322	0.961259	1.000000	0.999861	0.995541	
	{0} 18.000	{1} 17.000	{2} 16.000	{3} 19.333	{4} 16.000	{5} 18.000
3 {0}						
3 {1}	0.999861					
3 {2}	0.850402	0.999861				
3 {3}	0.995541	0.656322	0.130149			
3 {4}	0.850402	0.999861	1.000000	0.130149		
3 {5}	1.000000	0.999861	0.850402	0.995541	0.850402	

{0} = testigo; {1-5} = concentraciones del metal; 1 =  $0.25 \times 10^6$  céls. ml<sup>-1</sup>; 2 =  $0.75 \times 10^6$  céls. ml<sup>-1</sup>; 3 =  $2.25 \times 10^6$  céls. ml<sup>-1</sup>.

Tabla 8. Prueba de Tukey para la abundancia máxima con las densidades 1, 2 y 3 de *Chlorella* y seis concentraciones del cloruro de plomo. Las diferencias significativas se observan en negritas.

	{0}	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	883.333	1073.667	722.667	588.333	691.667	356.667
1 {0}						
1 {1}	0.275797					
1 {2}	0.551159	<b>0.000602</b>				
1 {3}	<b>0.005836</b>	<b>0.000168</b>	0.808763			
1 {4}	0.026582	<b>0.000265</b>	1.000000	0.972566		
1 {5}	<b>0.000168</b>	<b>0.000168</b>	<b>0.000376</b>	0.073134	<b>0.001098</b>	
	{0}	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	1498.333	1375.000	1175.000	1011.667	1101.667	555.000
2 {0}						
2 {1}	0.888876					
2 {2}	<b>0.001756</b>	0.209050				
2 {3}	<b>0.000168</b>	<b>0.000405</b>	0.523554			
2 {4}	<b>0.000217</b>	<b>0.014452</b>	0.999296	0.992774		
2 {5}	<b>0.000168</b>	<b>0.000168</b>	<b>0.000168</b>	<b>0.000169</b>	<b>0.000168</b>	
	{0}	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	2165.000	2145.000	2135.000	1856.667	2130.000	700.000
3 {0}						
3 {1}	1.000000					
3 {2}	1.000000	1.000000				
3 {3}	<b>0.003305</b>	<b>0.007738</b>	<b>0.011752</b>			
3 {4}	1.000000	1.000000	1.000000	<b>0.014452</b>		
3 {5}	<b>0.000168</b>	<b>0.000168</b>	<b>0.000168</b>	<b>0.000168</b>	<b>0.000168</b>	

{0} = testigo; {1-5} = concentraciones del metal; 1 =  $0.25 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ; 2 =  $0.75 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ; 3 =  $2.25 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ .

Tabla 9. Prueba de Tukey para la tasa de crecimiento poblacional con las densidades 1, 2 y 3 de *Chlorella* y seis concentraciones del cloruro de plomo. Las diferencias significativas se observan en negritas.

	{0}	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	0.34333	0.31400	0.28567	0.25567	0.24200	0.25700
1 {0}	---					
1 {1}	0.134185	---				
1 {2}	<b>0.000179</b>	0.169664	---			
1 {3}	<b>0.000168</b>	<b>0.000177</b>	0.114077	---		
1 {4}	<b>0.000168</b>	<b>0.000168</b>	<b>0.002127</b>	0.980102	---	
1 {5}	<b>0.000168</b>	<b>0.000183</b>	0.157097	1.000000	0.954898	---
	{0}	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	0.38133	0.32300	0.30767	0.30400	0.30533	0.27500
2 {0}	---					
2 {1}	<b>0.000177</b>	---				
2 {2}	<b>0.000168</b>	0.946064	---			
2 {3}	<b>0.000168</b>	0.771094	1.000000	---		
2 {4}	<b>0.000168</b>	0.850906	1.000000	1.000000	---	
2 {5}	<b>0.000168</b>	<b>0.000616</b>	0.057077	0.145282	0.105009	---
	{0}	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	0.40700	0.34467	0.34267	0.33833	0.33800	0.29200
3 {0}	---					
3 {1}	<b>0.000170</b>	---				
3 {2}	<b>0.000169</b>	1.000000	---			
3 {3}	<b>0.000168</b>	0.999999	1.000000	---		
3 {4}	<b>0.000168</b>	0.999997	1.000000	1.000000	---	
3 {5}	<b>0.000168</b>	<b>0.000254</b>	<b>0.000341</b>	<b>0.000968</b>	<b>0.001066</b>	---

{0} = testigo; {1-5} = concentraciones del metal; 1 =  $0.25 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ; 2 =  $0.75 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ; 3 =  $2.25 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ .



Tabla 10. Prueba de Tukey para el día de abundancia máxima con las densidades 1, 2 y 3 de *Chlorella* y seis concentraciones del cloruro de cadmio. Las diferencias significativas se observan en negritas.

	<b>{0}</b> <b>12.000</b>	<b>{1}</b> <b>18.667</b>	<b>{2}</b> <b>16.000</b>	<b>{3}</b> <b>10.333</b>	<b>{4}</b> <b>10.000</b>	<b>{5}</b> <b>17.000</b>
1 {0}	---					
1 {1}	0.006244	---				
1 {2}	<b>0.397360</b>	<b>0.922084</b>	---			
1 {3}	<b>0.999294</b>	0.000369	0.037658	---		
1 {4}	<b>0.994275</b>	0.000267	0.021084	<b>1.000000</b>	---	
1 {5}	<b>0.109905</b>	<b>0.999294</b>	<b>0.999999</b>	0.006244	0.003339	---
	{0} 12.333	{1} 19.000	{2} 15.667	{3} 10.333	{4} 10.667	{5} 18.333
2 {0}	---					
2 {1}	<b>0.006244</b>	---				
2 {2}	0.694735	0.694735	---			
2 {3}	0.994275	<b>0.000267</b>	0.065403	---		
2 {4}	0.999294	<b>0.000369</b>	0.109905	1.000000	---	
2 {5}	<b>0.021084</b>	1.000000	0.922084	<b>0.000580</b>	<b>0.000996</b>	---
	{0} 12.333	{1} 14.333	{2} 12.667	{3} 12.667	{4} 12.667	{5} 18.000
3 {0}	---					
3 {1}	0.994275	---				
3 {2}	1.000000	0.999294	---			
3 {3}	1.000000	0.999294	1.000000	---		
3 {4}	1.000000	0.999294	1.000000	1.000000	---	
3 {5}	<b>0.037658</b>	0.543710	0.065403	<b>0.065403</b>	<b>0.065403</b>	---

{0} = testigo; {1-5} = concentraciones del metal; 1 =  $0.25 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ; 2 =  $0.75 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ; 3 =  $2.25 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ .

Tabla 11. Prueba de Tukey para la abundancia máxima con las densidades 1, 2 y 3 de *Chlorella* y seis concentraciones del cloruro de cadmio. Las diferencias significativas se observan en negritas.

	{0}	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	698.333	431.667	401.667	446.667	440.000	440.000
1 {0}	---					
1 {1}	<b>0.039984</b>	---				
1 {2}	<b>0.013087</b>	1.000000	---			
1 {3}	0.067405	1.000000	1.000000	---		
1 {4}	0.053624	1.000000	1.000000	1.000000	---	
1 {5}	0.053624	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000	---
	{0}	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	881.667	638.333	426.667	645.000	645.000	508.333
2 {0}	---					
2 {1}	0.088957	---				
2 {2}	<b>0.000178</b>	0.230137	---			
2 {3}	0.110268	1.000000	0.191366	---		
2 {4}	0.110268	1.000000	0.191366	1.000000	---	
2 {5}	<b>0.000697</b>	0.903717	0.998934	0.864626	0.864626	---
	{0}	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	1873.333	1236.667	1705.333	875.000	1451.667	816.667
3 {0}	---					
3 {1}	<b>0.000168</b>	---				
3 {2}	0.598181	<b>0.000173</b>	---			
3 {3}	<b>0.000168</b>	<b>0.001050</b>	<b>0.000168</b>	---		
3 {4}	<b>0.000229</b>	0.210088	0.062976	<b>0.000168</b>	---	
3 {5}	<b>0.000168</b>	<b>0.000233</b>	<b>0.000168</b>	0.999987	<b>0.000168</b>	---

{0} = testigo; {1-5} = concentraciones del metal; 1 =  $0.25 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ; 2 =  $0.75 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ; 3 =  $2.25 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ .

Tabla 12. Prueba de Tukey para la tasa de crecimiento poblacional con las densidades 1, 2 y 3 de *Chlorella* y seis concentraciones del cloruro de cadmio. Las diferencias significativas se observan en negritas.

	{0}	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	0.28867	0.22833	0.19800	0.20533	0.19367	0.15833
1 {0}	---					
1 {1}	<b>0.001187</b>	---				
1 {2}	<b>0.000168</b>	0.481762	---			
1 {3}	<b>0.000169</b>	0.865149	1.000000	---		
1 {4}	<b>0.000168</b>	0.268197	1.000000	0.999864	---	
1 {5}	<b>0.000168</b>	<b>0.000247</b>	0.114180	<b>0.025417</b>	0.241774	---
	{0}	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	0.33067	0.22567	0.19633	0.21667	0.18633	0.18300
2 {0}	---					
2 {1}	<b>0.000168</b>	---				
2 {2}	<b>0.000168</b>	0.538278	---			
2 {3}	<b>0.000168</b>	0.999996	0.944845	---		
2 {4}	<b>0.000168</b>	0.121471	0.999983	0.481762	---	
2 {5}	<b>0.000168</b>	0.063603	0.999265	0.311324	1.000000	---
	{0}	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	0.40967	0.27600	0.25933	0.23233	0.25033	0.16033
3 {0}	---					
3 {1}	<b>0.000168</b>	---				
3 {2}	<b>0.000168</b>	0.990947	---			
3 {3}	<b>0.000168</b>	0.051825	0.671497	---		
3 {4}	<b>0.000168</b>	0.743585	0.999996	0.980834	---	
3 {5}	<b>0.000168</b>	<b>0.000168</b>	<b>0.000168</b>	<b>0.000216</b>	<b>0.000168</b>	---

{0} = testigo; {1-5} = concentraciones del metal; 1 =  $0.25 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ; 2 =  $0.75 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ ; 3 =  $2.25 \times 10^6$  céls.  $\text{ml}^{-1}$ .