



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA**

**EFFECTO DE DOS METALES PESADOS (CADMIO Y  
MERCURIO) SOBRE EL CRECIMIENTO POBLACIONAL  
DEL ROTÍFERO *BRACHIONUS RUBENS* (ROTIFERA)  
SUMINISTRADOS A TRAVÉS DEL ALGA CARGADA Y  
DEL MEDIO**

**TESIS**

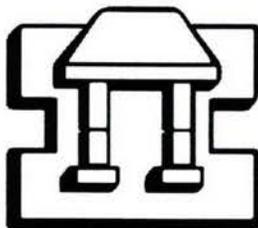
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**HILDA FABIOLA NÚÑEZ CRUZ**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. S. S. S. SARMA**



**IZTACALA  
TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2002.**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Sarma por brindarme la oportunidad de trabajar con él, por aceptar ser mi director , por su apoyo y consejos, gracias.

A la Dra. Nandini, al Mtro. José Luis, al Biol. Mario y al Dr. Cházaro por sus consejos para mejorar este trabajo.

Al Biol. Roberto Rico y al Dr. Sergio Vaca por ser mi profesores consentidos.

A mis padres gracias por su amor, apoyo, paciencia y confianza en mí.

A mis mejores amigos Fabian, Roberto, Galileo, Verónica, y Alejandra , por darle un significado muy especial a la amistad.

A Pablo por su ayuda en revisar este trabajo, por ser tan maravilloso y hacerme tan feliz.

Mil gracias por tu amor.

A mis hermanos Janine, Marisol, Maribel, Raúl e Isaías, por llenar mi vida de buenos momentos.

A los Castillo Cruz por hacer más bonita y grande la familia.

A Berni y Rodri por llenar la casa de alegría.

A Beatriz por convertirse en mi cómplice y escucharme siempre.

A todos, **Gracias.**

# INDICE

## IZT.

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>2</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
BRACHIONUS RUBENS.....	11
CHLORELLA VULGARIS .....	14
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>15</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
OBJETIVOS GENERALES.....	20
OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>MÉTODO.....</b>	<b>22</b>
ORGANISMOS .....	22
<i>Brachionus rubens</i> .....	22
<i>Alga (Chlorella vulgaris)</i> .....	22
SUBSTANCIAS.....	23
PRUEBAS DE TOXICIDAD AGUDA CON $CdCl_2$ EN EL MEDIO.....	23
PRUEBAS DE TOXICIDAD AGUDA CON $HgCl_2$ EN EL MEDIO .....	23
PRUEBAS DE TOXICIDAD CRÓNICA CON $CdCl_2$ EN EL MEDIO.....	24
PRUEBAS DE TOXICIDAD CRÓNICA CON $HgCl_2$ EN EL MEDIO.....	24

PRUEBAS DE TOXICIDAD CRÓNICA CON $CdCl_2$ EN EL ALGA CARGADA .....	25
PRUEBAS DE TOXICIDAD CRÓNICA CON $HgCl_2$ EN EL ALGA CARGADA .....	26
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA.....	28
EFECTO DE $CdCl_2$ EN EL MEDIO SOBRE EL CRECIMIENTO POBLACIONAL DE <i>B. RUBENS</i> .....	28
EFECTOS DE $CdCl_2$ A TRAVÉS DEL ALGA EN <i>B. RUBENS</i> .....	32
EFECTOS DEL $HgCl_2$ EN EL MEDIO SOBRE <i>B. RUBENS</i> .....	36
EFECTOS DE $HgCl_2$ A TRAVÉS DEL ALGA EN <i>B. RUBENS</i> .....	38
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>38</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>38</b>
<b>APÉNDICES</b> .....	<b>38</b>
APÉNDICE A .....	38
APÉNDICE B .....	38
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>38</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

$A_{max}$	Abundancia máxima
ANOVA	Análisis de varianza
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
cel	Célula
d	Día
EPA	Environment Protection Agency
GL	Grados de libertad
ind	Individuo
No	Densidad de población inicial
Nt	Densidad de población en el tiempo
Psc	Promedio de suma de cuadrados
r	Tasa poblacional
Sc	Suma de cuadrados
t	Tiempo

### Niveles de significancia:

*	P < 0.05
**	P < 0.01
***	P < 0.001
ns	no significativo

## RESUMEN

En el presente trabajo se observó el efecto de dos metales pesados (cadmio y mercurio) sobre el crecimiento poblacional de *Brachionus rubens*. Para las pruebas de toxicidad aguda (a 24 h) se emplearon 3.2 mg/L, 1.6 mg/L, 0.8 mg/L, 0.4 mg/L de CdCl<sub>2</sub>; y 0.08 mg/L, 0.04 mg/L, 0.02 mg/L de HgCl<sub>2</sub>, con lo cual se obtuvo la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de 0.84 mg/L para el cadmio y de 0.034 mg/L para el mercurio, por lo que el cadmio resulta 24 veces menos tóxico que el mercurio.

Las pruebas de toxicidad crónica se efectuaron de dos formas: con el tóxico en el medio o en el alimento (*Chlorella vulgaris* expuesta al tóxico), ambas a 15 días y con una densidad de *Chlorella vulgaris* de  $0.5 \times 10^6$  cel/mL. En el caso del tóxico agregado al medio, se emplearon 0.10 mg/L, 0.20 mg/L y 0.40 mg/L de CdCl<sub>2</sub>, ó 0.005 mg/L, 0.010 mg/L y 0.015 mg/L de HgCl<sub>2</sub>. En las pruebas de toxicidad crónica con el alga cargada, se utilizó *C. vulgaris* expuesta a una concentración de ocho veces mayor a la CL<sub>50</sub> de cada tóxico, durante 1, 2 ó 4 h; el alga cargada se centrifugó, se resuspendió en medio EPA, se contabilizó mediante un hemocitómetro y se suministró a densidades de  $0.5 \times 10^6$  cel/mL durante quince días en un sistema semi-estático, es decir, manteniendo una concentración o nivel de toxicidad constante durante toda la prueba y renovando periódicamente (cada 24 h) el medio que contiene al metal pesado. Se observó que el crecimiento poblacional de *B. rubens* fue inversamente proporcional a las concentraciones de los metales pesados.

En el caso del cadmio, la tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) y  $A_{\max}$  disminuyeron significativamente al incrementarse la concentración del metal en el medio así como al aumentar el tiempo de exposición del alga al cadmio. En el caso del mercurio, las variables " $r$ " y  $A_{\max}$  también presentaron una disminución estadísticamente significativa, al incrementarse la concentración del mercurio en el medio así como al aumentar el tiempo de exposición del alga al mercurio.

Con base en lo anterior, se concluye que *B. rubens* fue más sensible al  $\text{HgCl}_2$  que al  $\text{CdCl}_2$ , tanto cuando se adicionó al medio, como en el caso donde el alga fue previamente expuesta al metal.

# INTRODUCCIÓN

La rápida industrialización y la urbanización son los principales factores que contribuyen al incremento de niveles de sustancias tóxicas, incluyendo los de metales pesados (Buikema., 1974). Éstos contaminantes son introducidos a medios acuáticos mediante erupciones volcánicas o actividades mineras e industriales del hombre, debido a que en muchos casos, las aguas residuales llegan crudas a los ríos y otros cuerpos de agua, causando una disminución en la diversidad y abundancia de diversas especies acuáticas (Calow, 1993). La peligrosidad de los metales pesados es mayor al no ser química ni biológicamente degradables, por lo que persisten en el sistema y se acumulan en la cadena trófica. Los compuestos con los cuales se asocian estos contaminantes por ejemplo, la materia orgánica, pueden degradarse o alterarse, pero no así los metales, los cuales solamente pueden cambiar de forma química según el pH, la temperatura, la salinidad, las condiciones de oxidoreducción del medio y las actividades bioquímicas, formándose en algunos casos compuestos que pueden ser todavía más tóxicos que el mismo metal (Bryan, 1976).

Entre los metales pesados que causan graves problemas de salud y ambientales, están el mercurio, el cadmio, el níquel, el estaño, el vanadio y el cinc (Margalef, 1980). Aún cuando metales como el cinc, son micronutrientes esenciales, hay metales como el mercurio y el cadmio, que son del todo ajenos a la vida (Laws, 1993). Los metales pesados inhiben el sistema enzimático afectando los procesos fisiológicos y bioquímicos de los organismos (Travieso, 1998).

Los ecosistemas dulceacuícolas, tienen condiciones tróficas comúnmente lineares, comenzando con el fitoplancton (algas y algunas bacterias), pasando por el zooplancton (constituido por protozoarios, rotíferos, crustáceos, cladóceros y copépodos), llegando hasta los peces y crustáceos. Es importante destacar que cualquier cambio causado por sustancias tóxicas en algún nivel de esta cadena trófica, tiene consecuencias en los otros (Hutchinson, 1967). Dependiendo de la concentración de metales pesados, algunos organismos acuáticos pueden acumular metales pesados en su estructura protoplásmica sin sufrir efectos tóxicos, pero al ser ingeridos a su vez por otros organismos, provocan que las concentraciones de metales se incrementen en los consumidores, alcanzando o aún rebasando las concentraciones letales de muchas especies.

Los rotíferos son pequeños invertebrados acuáticos o semi-acuáticos dulceacuícolas en su mayoría, que se utilizan frecuentemente en estudios de toxicología acuática. El phylum Rotifera, se compone de organismos bilateralmente simétricos, no segmentados y pseudocelomados. Su tamaño oscila entre 40 y 1000  $\mu\text{m}$  de longitud, aunque hay especies que pueden rebasar los 2000  $\mu\text{m}$  (Sarma, 1990; Nogrady *et al.*, 1993).

Los rotíferos muestran un amplio margen de variabilidad en sus adaptaciones y variaciones morfológicas. En una gran mayoría la forma del cuerpo tiende a alargarse, distinguiéndose tres regiones: cabeza, tronco y pie (Krebs, 1989). La cutícula que los cubre es casi siempre delgada y flexible, aunque puede encontrarse engrosada y rígida, denominándose en este caso lóriga. Esta distinción es muy relevante en estudios taxonómicos de algunos grupos. El extremo anterior de los rotíferos, mejor conocido como corona, se encuentra ciliada y en

algunas especies, esta característica se presenta en toda la periferia. El movimiento de los cilios sirve tanto para locomoción, como para llevar el alimento a la boca creando corrientes. La boca, generalmente es anterior y el aparato digestivo consta de un complejo mastax que sirve para fijar y trocear las partículas de alimento (Barnés, 1995).

Los rotíferos se dividen en dos clases según el número de gónadas: digonontos y monogonontos. Los monogonontos tienen hembras partenogénéticas (Pennak, 1989). Estas hembras amícticas son diploides y producen huevos amícticos, también diploides, que dan lugar a hembras amícticas. Bajo condiciones óptimas, las poblaciones de hembras amícticas pueden desarrollarse rápidamente en cuestión de 2 a 5 días con buenas condiciones de crecimiento. Si las condiciones ambientales no son tan favorables, se llegan a producir hembras míticas las cuales experimentan una división meiótica normal doble. Si estas hembras son fertilizadas por machos, los huevos se desarrollan con una cubierta resistente, característica que les permite superar condiciones adversas. En contraste, cuando la hembra mítica no es fertilizada, entonces se desarrollan machos muy pequeños los cuales son individuos de vida muy corta. Sus tasas de reproducción son más altas que las de cualquier otro metazoo (Barnés, 1995).

La familia *Brachionidae*, tiene una gran importancia en el plancton, son muy abundantes y comunes en aguas dulces o salobres de México. Esta familia presenta mástax maleado y se divide en 7 géneros: *Anuraeopsis*, *Brachionus*, *Keratella*, *Kellicottia*, *Paranuraeopsis*, *Platyias*, *Notholca* (Koste, 1978).

Las especies de *Brachionus* son típicas de aguas alcalinas y aunque están presentes en regiones templadas, tropicales y subtropicales, se les considera principalmente tropicales. Su tamaño varía entre 150 a 200  $\mu\text{m}$ , se les ha encontrado en cuerpos de agua eutróficos y contaminados. Es común que se adhieran al caparazón de cladóceros como *Daphnia magna* y en aguas limpias, puede nadar en el plancton. *Brachionidae* es una especie cosmopolita (Sládecek, 1983).

### **Brachionus rubens**

*Brachionus rubens* (Figura 1) presenta lórica, mide aproximadamente 150 a 200 $\mu\text{m}$ , es epizoico, no presenta espinas posteriores ni posterolaterales. Tiene seis espinas, seis en la placa dorsal, dos en la placa ventral. Se usa como alimento de larvas.



**Figura 1. *Brachionus rubens* (150  $\mu\text{m}$ ).**

Los rotíferos son muy útiles en estudios de contaminación del agua (Vilaclara y Sládecek, 1989), pues entre los organismos del zooplancton, parecen ser los indicadores más sensibles de las propiedades del agua, así que la presencia de ciertas especies podría ser usada como

una referencia de las características físicas y químicas de su hábitat, además de que pueden proporcionar indicaciones tempranas de cambios ambientales antes de que declinen las poblaciones de otras especies y marcar también el progreso de recuperación de un lago cuando el estrés ambiental ha disminuido.

Los rotíferos son organismos aceptados en la American Society of Testing and Materials (Snell y Janssen, 1995) y podemos encontrar las siguientes ventajas en su uso como indicadores de condiciones ambientales:

1. Son fácilmente identificables.
2. Responden más rápidamente a los cambios ambientales que los peces.
3. Tienen el índice de incremento natal más alto entre los principales grupos zooplanctónicos.
4. Son fácilmente manipulables en laboratorio.
5. Muchas especies son cosmopolitas.
6. Experimentar con ellos resulta de muy bajo costo.

Dentro de los estudios que se pueden hacer con rotíferos se encuentran la determinación y vigilancia de concentraciones tóxicas (Sarma, 1998; Sarma, 1999). Debido a que los rotíferos son alimento vivo para muchos alevines (Sarma,1991), el estudio de la toxicidad de los rotíferos es muy útil para aumentar la actividad de pesca y para mejorar la salud general de cuerpos de agua.

Entre las pruebas utilizadas en la ecotoxicología, la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) es muy importante y se obtiene mediante la prueba de toxicidad aguda y nos da la concentración en la cual el 50% de los organismos muere. A partir de este resultado, y con el fin de encontrar las concentraciones subletales, es muy útil el uso de la prueba de toxicidad crónica la cual consiste en la exposición prolongada al tóxico en un sistema semi-estático, es decir, renovando el medio cada 24h y llevando el registro diario del crecimiento poblacional.

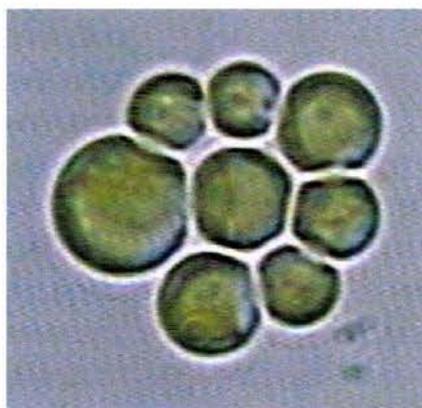
En México existen algunos trabajos de ecotoxicología con rotíferos que utilizan las pruebas de toxicidad crónica y aguda, bioacumulación, crecimiento poblacional, tabla de vida, concentración efectiva media, dosis letal mínima (DLM), dosis máxima no letal en 24 horas (DMNF), dosis mínima siempre letal en 24 horas (DMSF) (Duffus, 1983), estas pruebas han servido de base en la elaboración de normas oficiales que determinan las concentraciones tóxicas de diferentes contaminantes presentes en cuerpos de agua (Sarma, 2000).

En los sistemas acuáticos o cuerpos de agua, la cadena trófica establece una importante línea o cadena de contaminación, es decir, que si los diferentes niveles tróficos están relacionados entre sí, entonces la contaminación entra a diferentes niveles o medios en el cuerpo de agua. Por ejemplo, el excesivo crecimiento de algas en estanques de acuicultura, se controla con la aplicación de compuestos de cobre, y como consecuencia, la producción de zooplancton disminuye al no haber suficiente alimento disponible (Hawkins y Griffiths, 1987). Las microalgas, se encuentran directamente ligadas a los rotíferos dentro de la

cadena trófica pues es su alimento principal, lo cual sugiere una posible vía de investigación debido a la facilidad de manipulación de ambos.

### **Chlorella vulgaris**

*Chlorella vulgaris* (Figura 2), es una microalga verde, adecuada para varias especies de rotíferos tales como los géneros *Brachionus*, *Euchlanis* y *Lepadella*, además existen varios estudios en los cuales *Chlorella vulgaris* ha sido exitosamente utilizada como alimento único para *B. rubens* (Boraas, 1993). *Chlorella vulgaris*, es una especie sensible que responde rápidamente a cambios en el ambiente. Esta especie, se cultiva usando el medio de cultivo basal Bold (Borowitzka & Borowitzka, 1988).



**Figura 2. *Chlorella vulgaris*.**

En el presente trabajo se estudiaron los efectos del cadmio y del mercurio sobre la dinámica poblacional de una especie de rotífero (*B. rubens*) comparando su efecto por dos vías o formas de administración: una a través del medio y otra por medio del alga (*Chlorella vulgaris*) previamente expuesta a los metales pesados a diferentes tiempos.

## ANTECEDENTES

La toxicidad de los metales pesados además de depender de la concentración a la que se encuentren y de su forma química, también varía en relación con la especie afectada o etapa de ciclo de vida en la que se encuentren. Bryan ( 1976) realizó un trabajo en el cual demostró que el mercurio es más tóxico para *Acartia sp.* que para *Artemia sp.* probablemente porque el tegumento de la segunda posee una mayor impermeabilidad que el de la primera. En tanto que Madsen (1992), en un experimento con *Crangon crangon* (crustáceo), encontró que los organismos jóvenes son más sensibles al arsénico que los organismos adultos.

Existen diversos estudios de ecotoxicidad que utilizan el género *Brachionus* como organismo de bioensayo, esto se debe a que este ha sido aceptado por el American Society of Testing and Materials (Yúfera,2001). En este contexto, pruebas de toxicidad crónica han demostrado que los niveles de mercurio tan bajos como 1/50 de la CL<sub>50</sub>, pueden causar efectos negativos en el crecimiento poblacional de brachionidos (Sarma y col., 2001).

Un estudio de Pickard (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. Por lo tanto es necesario poner mucho énfasis en el control de la concentración de algas en el medio.

Woodwell (1967), realizó un experimento en el cual demostró el fenómeno de la biomagnificación, midiendo la concentración de tóxico presente en diferentes niveles de la cadena trófica alcanzando una concentración alrededor de 80 veces más alta en peces que en el primer nivel trófico o inclusive que en el agua. También se ha demostrado, que los metales pesados son progresivamente concentrados en niveles tróficos más elevados en cadenas alimenticias acuáticas debido a la biomagnificación. En un estudio similar, se tomaron muestras entre Hawai y California de zooplancton, fitoplancton y agua demostrándose que las concentraciones de metales encontrados en el fitoplancton eran aproximadamente tres veces mayores que las encontradas en el agua y las encontradas en el zooplancton, considerablemente mayores que las del fitoplancton (Laws, 1995).

Los metales pesados adsorbidos o acumulados por el alga pasan al zooplancton debido a que son ingeridos, lo que les provoca una sobrevivencia y o reproducción afectada (Barata y col., 2002). También cabe señalar que el resultado neto de sobrevivencia y o reproducción del zooplancton expuesto a tóxicos puede ser cuantificado usando estudios de crecimiento poblacional, donde individuos de varias generaciones coexisten durante un largo período (Gama-Flores, y col. 2000).

Young (1970), demostró que la proporción de cesio potasio (Cs/K) encontrada en varias especies de peces en el sudeste de California, aumenta con respecto al nivel trófico anterior. Después, analizó a varios peces similares en el Golfo de California, y el Cs/K encontrado fue muy similar en todos los peces, pero 16 veces más alto que en las algas.

Wong (1987), observó que dentro del fitoplancton existen variaciones en cuanto a la sensibilidad al cadmio. Aparentemente esto se debe a la acumulación del cadmio ya sea intra o extracelular. La acumulación del cadmio se lleva a cabo de diferente manera dependiendo de la especie, por ejemplo, en el caso de *Chlorella regularis* se ha observado que no presenta absorción intracelular sino exclusivamente extracelular.

En un trabajo de Travieso y col. (1998), se demostró que metales pesados como Zn, Cd y Cr son absorbidos del ambiente por microalgas como *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*, siendo afectadas en su tasa de crecimiento. También Cañizares (1999), realizó un estudio de toxicidad aguda con *Daphnia magna* para probar la toxicidad de varios metales pesados como Cd, Zn, Ag, Mn y Ag, después de haber sido inmovilizados o sustraídos del ambiente por microalgas de *Chlorella vulgaris* y de acuerdo con sus resultados, comprobó que la presencia de algas, puede modificar la concentración de los residuos tóxicos de los metales pesados.

Las microalgas son frecuentemente utilizadas en estudios de ecotoxicología para determinar la toxicidad del ambiente. Existen estudios que utilizan algunas especies de *Chlorella* en aguas que contienen metales pesados para evaluar la toxicidad del metal, la tolerancia de las microalgas y la remoción de metales pesados en aguas de tratamientos biológicos (Cañizares y col., 1999).

## JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la contaminación acuática es uno de los problemas más importantes en México, y entre los contaminantes más dañinos, se encuentran los metales pesados debido a nuestra actividad minera e industrial en los diferentes estados de la república (Méndez y col. 2002). Los metales pesados, son difíciles de desechar y se acumulan en los organismos provocando desde un decremento en las poblaciones hasta la muerte de los individuos (Laws, 1993).

Hoy en día, es común el uso de rotíferos como organismos de bioensayo en estudios de contaminación acuática, específicamente, la familia de los *Brachionidos*, se ha usado en trabajos de ecotoxicología de México de niveles permitidos de metales pesados ya que es muy común en los cuerpos de agua a nivel nacional. *Brachionus* es además un género cosmopolita por lo que los datos son útiles en otros países. Se recomienda utilizar rotíferos pues son más sensibles a los cambios o calidad del agua que otros organismos del zooplancton además de que los rotíferos pueden aumentar sus poblaciones en menor tiempo (Edmondson, 1968) y son más manipulables que los copépodos o los cladóceros pues éstos últimos se mueven más aprisa. Otro punto fundamental a considerar, es la importancia de los rotíferos pues constituyen el alimento de larvas de peces y de algunos crustáceos.

La mayoría de los estudios de ecotoxicología de rotíferos realizados hasta hoy, se han hecho utilizando el tóxico en solución con el medio. Sin embargo, se ha demostrado que las concentraciones de tóxicos en el medio, son superadas en los niveles tróficos más altos,

debido a que se acumulan en la cadena trófica, teniendo como resultado la mortalidad de los individuos de manera directa e indirecta (Laws, 1993). Por este motivo, es importante exponer a los rotíferos al tóxico por medio de dos vías, es decir, a través del medio y del alga cargada con el tóxico.

IZT.



# OBJETIVOS

## Objetivos generales

- Estudiar la toxicidad crónica y aguda usando los metales pesados seleccionados ( $\text{CdCl}_2$  y  $\text{HgCl}_2$ ) a través del medio y del alga cargada sobre algunas variables poblacionales de *B. Rubens* (rotífero).

## Objetivos particulares

- Determinar el efecto agudo ( $\text{CL}_{50}$ ) de  $\text{CdCl}_2$  y  $\text{HgCl}_2$  con el rotífero *Brachionus rubens*.
- Estimar el efecto de diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  sobre el crecimiento poblacional de *Brachionus rubens* a través de alga cargada con el metal pesado y a través del medio.
- Cuantificar el efecto de diferentes concentraciones de  $\text{HgCl}_2$  sobre el crecimiento poblacional de *Brachionus rubens* a través de alga cargada con el metal pesado y a través del medio.
- Derivar algunas variables como abundancia máxima, día de abundancia máxima y tasa de crecimiento poblacional de *Brachionus rubens* bajo condiciones de estrés, concentraciones subletales de  $\text{CdCl}_2$  y  $\text{HgCl}_2$ )

## HIPÓTESIS

- La toxicidad de  $\text{CdCl}_2$  y  $\text{HgCl}_2$  puede variar dependiendo de la forma en la que se suministren y de su concentración.
- El mercurio afectará más las respuestas que el cadmio para *B. rubens*.
- *B. rubens* puede ser más sensible con algunos metales.

# MÉTODO

## Organismos

### *Brachionus rubens*

La especie de *Brachionus rubens* utilizada en este trabajo fue aislada de un pequeño cuerpo de agua ubicado en la colonia Aragón, Distrito Federal. La especie se cultivó masivamente usando una solución fisiológica estandarizada conocida como “agua reconstituida o medio EPA” (ver Apéndice A). Las características de la solución fisiológica son de: una temperatura de 27-28 °C, un pH de 7.5 y una aireación constante. Estas condiciones favorecen desarrollo de muchas especies de la familia Brachionidae, así como el de otras familias de rotíferos (Snell, 1987). Los rotíferos se mantuvieron en condiciones de iluminación difusa y fueron alimentados con la microalga *Chlorella vulgaris*. Para el mantenimiento de rutina, al igual que para los experimentos, se usó Medio EPA (Anon,1985).

### *Alga (Chlorella vulgaris)*

*Chlorella vulgaris* fue aislada del aire por Vega en 1996 y está registrada en el CICESE de Ensenada, Baja California con la clave CL-V-3. Para alimentar las poblaciones, se cultivó el alga en forma masiva, en condiciones asépticas, utilizando botellas transparentes de 2 L. El cultivo se mantuvo con iluminación artificial continua (aproximadamente 3000 lux) y con aireación constante, a una temperatura de 25-26°C en el medio de crecimiento basal de Bold (Borowitzka y Borowitzka, 1988) (ver Apéndice B). Como fuente de carbono

adicional al medio de cultivo, se utilizó bicarbonato de sodio. Referente a la cosecha de la microalga, se hizo cuando el alga se encontraba en fase de crecimiento logarítmico ( $10^6$  cél/ml) y se decantó con el fin de concentrarlas para su uso experimental.

## **Substancias**

Se prepararon soluciones base o “stock” de 1 mg/L de  $\text{HgCl}_2$  y de  $\text{CdCl}_2$  con agua destilada y se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  durante el período experimental tomando de ahí los volúmenes necesarios para preparar con el medio EPA las diferentes concentraciones a utilizar.

## **Pruebas de toxicidad aguda con $\text{CdCl}_2$ en el medio**

Como ya se ha señalado, se trabajó con la especie de rotífero: *Brachionus rubens* y las siguientes cuatro concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  : 0.1, 0.2, 0.4, 0.8mg/L más el control. Cada concentración de metal se hizo por triplicado y para cada replica se utilizaron 50 individuos en 20ml (sin huevos). La concentración letal 50 se determinó usando el método *Probit* (Finney,1971).

## **Pruebas de toxicidad aguda con $\text{HgCl}_2$ en el medio**

Para esta prueba, se utilizó la misma especie de rotífero: *Brachionus rubens* y las siguientes cuatro concentraciones de  $\text{HgCl}_2$  : 0.01, 0.04, 0.08, 0.16mg/L más un control. En cada concentración de metal se realizó con las mismas condiciones de la prueba del Cd al igual que la concentración letal 50 se determinó usando el método *Probit* (Finney,1971).

### **Pruebas de toxicidad crónica con CdCl<sub>2</sub> en el medio**

Se evaluó a través de la dinámica poblacional de la especie de rotífero (*Brachionus rubens*). Y se utilizaron las siguientes cuatro concentraciones subletales de CdCl<sub>2</sub>: 0.1mg/L, 0.2 mg/L, 0.4 mg/L incluyendo los controles basados en los datos obtenidos en los experimentos de toxicidad aguda y una misma concentración de alimento (*Chlorella vulgaris*) para cada metal pesado ( $0.5 \times 10^6$  cél/ml). Para cada tratamiento se hicieron cuatro réplicas. Diariamente se hicieron conteos poblacionales de dos alícuotas de un mililitro y se cambió la solución por medio fresco, con las condiciones experimentales originales. Los experimentos de crecimiento se terminaron cuando la mayoría de las réplicas empezaron a declinar de acuerdo con Dumont y col.(1995). Con los datos obtenidos, se determinó la tasa de incremento poblacional (r) usando la siguiente ecuación (Krebs, 1985):  $r = (\ln N_t - \ln N_0) / t$ , donde  $N_0$  = densidad de población inicial y  $N_t$  = densidad de población en el tiempo t: “r” se obtuvo de la media de 4-5 valores durante la fase exponencial del crecimiento poblacional de cada especie.

### **Pruebas de toxicidad crónica con HgCl<sub>2</sub> en el medio**

Se realizó a través de la dinámica poblacional de *Brachionus rubens* para lo cual se utilizaron las concentraciones de HgCl<sub>2</sub> de: 0.005 mg/L, 0.01 mg/L, 0.015 mg/L incluyendo los controles basados en los datos obtenidos en los experimentos de toxicidad aguda y una misma concentración de alimento para cada metal pesado ( $0.5 \times 10^6$  cél/ml). Para cada tratamiento se hicieron cuatro réplicas. Diariamente se hicieron conteos poblacionales y se cambió la solución del medio. Los experimentos de crecimiento se terminaron cuando la mayoría de las réplicas empezaron a declinar de acuerdo con Dumont et al. (1995).

Con los datos obtenidos, se determinó la tasa de incremento poblacional ( $r$ ) usando la siguiente ecuación (Krebs, 1985):  $r = (\ln N_t - \ln N_0)/t$ , donde  $N_0$  = densidad de población inicial y  $N_t$  = densidad de población en el tiempo  $t$ : “ $r$ ” se obtuvo de la media de 4-5 valores durante la fase exponencial del crecimiento poblacional de cada especie.

### **Pruebas de toxicidad crónica con $\text{CdCl}_2$ en el alga cargada**

Esta prueba se realizó mediante la dinámica poblacional con el tóxico en el alga expuesta al tóxico con una concentración de ocho veces la  $\text{CL}_{50}$  de  $\text{CdCl}_2$  y se hizo de la siguiente manera: inicialmente se prepararon 400ml a una concentración de 15mg/L de  $\text{CdCl}_2$ , a lo cual se le adicionaron 200ml de *Chlorella* concentrada y 200ml de Medio Bold. Los 800ml totales, se conectaron al oxígeno y se mantuvieron en contacto directo con luz blanca artificial durante una, dos y cuatro horas. Al finalizar cada uno de estos períodos, se centrifugaron las muestras por separado durante cinco minutos a una velocidad de 3000rpm, desechando los sobrenadantes y recuperando las pastillas con agua destilada. Posteriormente, se realizó un conteo de algas con ayuda de un microscopio óptico y un hemocitometro, haciendo diluciones de 1/100 de cada muestra. A continuación, se prepararon réplicas por triplicado de cada muestra tomada a la hora, dos horas y cuatro horas, con 20ml de medio con un total de medio millón de células de *Chlorella* y veinte individuos por réplica además de tres réplicas control sin tóxico. Cada día, se hizo un conteo poblacional de rotíferos de una alícuota de 1 ml y se cambió diariamente el medio con el alga cargada a las diferentes horas de exposición a una misma concentración. Este conteo se hizo durante dos o tres semanas dependiendo del ciclo poblacional de los

rotíferos. Basándose en los datos obtenidos, se derivaron algunas variables como: tasa de crecimiento poblacional, día de abundancia máxima, y abundancia máxima.

Para validar los datos con ambos tratamientos y metales pesados se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) y distribución de F.; los resultados se interpretaron y discutieron con base en la información disponible en la literatura.

### **Pruebas de toxicidad crónica con HgCl<sub>2</sub> en el alga cargada.**

Se evaluó a través de la dinámica poblacional con el tóxico en el alga cargada con una concentración de ocho veces de HgCl<sub>2</sub> y se hizo de la siguiente manera: Inicialmente se prepararon 400ml a una concentración de 10mg/L de CdCl<sub>2</sub>, a lo cual se le adicionaron 200mL de *Chlorella* concentrada y 200 mL de Medio Bold. Los 800 mL totales, se conectaron al oxígeno y se pusieron en contacto directo con luz blanca artificial durante una, dos y cuatro horas. Al finalizar cada uno de estos períodos, se centrifugaron las muestras por separado durante cinco minutos a una velocidad de 3000 rpm, desechando los sobrenadantes y recuperando las pastillas con agua destilada. Posteriormente, se hizo un conteo de algas con ayuda de un microscopio óptico y un hemocitometro haciendo diluciones de 1/100 de cada muestra. A continuación, se prepararon réplicas por triplicado de cada muestra tomada a la hora, dos horas y cuatro horas, con 20ml de medio con un total de medio millón de células de *Chlorella* y veinte individuos por réplica además de tres réplicas control sin tóxico. Cada día, se hizo un conteo poblacional de rotíferos de una alícuota de 1 mL cambiando diariamente el medio con el alga cargada a las diferentes horas

de exposición a una misma concentración. Este conteo se realizó durante dos o tres semanas dependiendo del ciclo poblacional de los rotíferos. Basándose en los datos obtenidos, se derivaron algunas variables como: tasa de crecimiento poblacional, día de abundancia máxima, y abundancia máxima.

Los resultados obtenidos con ambos tratamientos y metales pesados se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) y distribución de F., se interpretaron y discutieron con base en la información disponible en la literatura.

## RESULTADOS

### Concentración letal media

Como se muestra en la Tabla 1, la concentración letal media obtenida en *Brachionus rubens* con CdCl<sub>2</sub> fue de 0.8407 ± 0.011mg/L y en el HgCl<sub>2</sub> 0.034 ± 0.002mg/L, es decir, que el mercurio resultó 24 veces más tóxico que el cadmio.

**Tabla 1. Concentración letal cincuenta de *B. rubens* en bioensayo (24 h) de toxicidad aguda en ausencia de alimento. Los valores son el promedio y ± SE de tres réplicas.**

<b>Metal pesado (mg/L)</b>	<b>Promedio ± SE</b>
CdCl <sub>2</sub>	0.840 ± 0.011
HgCl <sub>2</sub>	0.032 ± 0.002

### Efecto de CdCl<sub>2</sub> en el medio sobre el crecimiento poblacional de *B. rubens*

El crecimiento poblacional de *Brachionus rubens* expuesto a diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub>, se mostró diferente al control en todas las concentraciones de las muestras, mostrando un menor crecimiento en las concentraciones más elevadas de CdCl<sub>2</sub> así como una pausa o intervalo de respuesta en las primeras semanas con el fin de elevar la densidad, tomándole así más tiempo en subir su población (Figura 3). La abundancia máxima observada en las muestras fue disminuyendo en comparación con el control conforme las concentraciones aumentaron ya que en el control se obtuvo una abundancia máxima de 32

$\pm 0.44$  ind/ml, mientras que en las muestras fue de  $31 \pm 1.5$  ind/ml,  $29.6 \pm 0.37$  ind/ml y  $22.12 \pm 2.76$  ind/ml (Figura 4). El día de abundancia máxima fue tres días posterior en las muestras que en el control ya que en éste la abundancia máxima se presentó en un promedio de  $9.6 \pm 0.66$  días, y en las muestras fue en un promedio de 12.6 días (Figura 5). Tras realizar las pruebas estadísticas de (ANOVA) análisis de varianza y distribución de F, comprobamos que se encontró una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los valores de densidad de población máxima y tasa de crecimiento de los diferentes tratamientos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Resultados de análisis de varianza utilizando valores de abundancia máxima y tasa de crecimiento poblacional de *B. rubens* en relación con diferentes concentraciones de  $\text{CdCl}_2$ . Los valores mencionados son tratamiento, grados de libertad, suma de cuadrados, promedio de suma de cuadrados y relación de F.

Variación	GL	Sc	Psc	F
<b>Densidad poblacional maxima</b>				
Entre tratamientos	3	304.5	101.5	17.22***
Error	8	47.167	5.9	
<b>Tasa de crecimiento</b>				
Entre tratamientos	3	0.059	0.02	17.89***
Error	8	0.009	0	

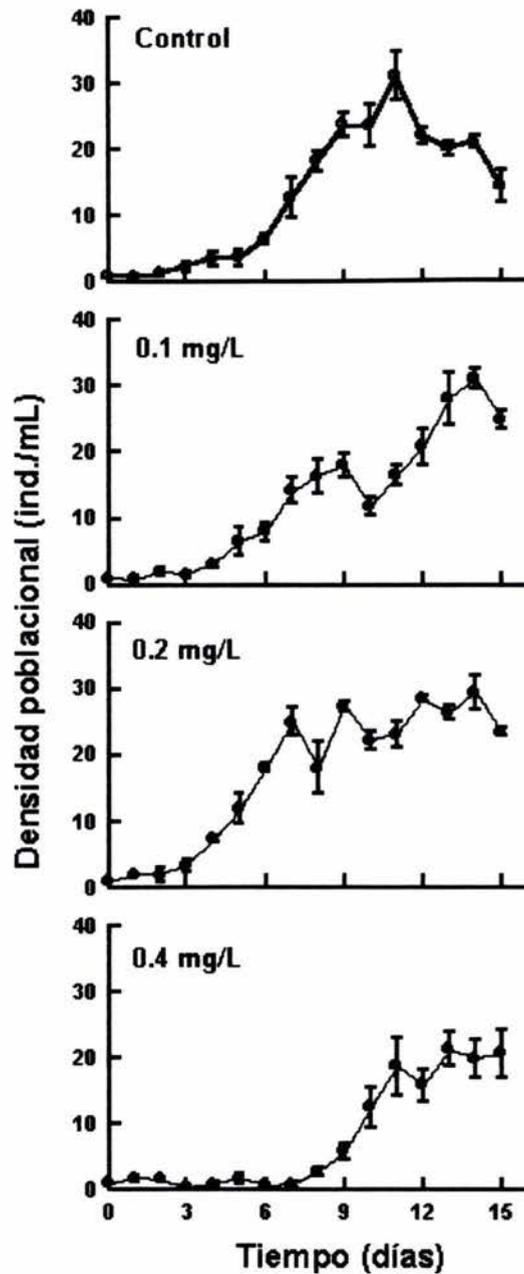
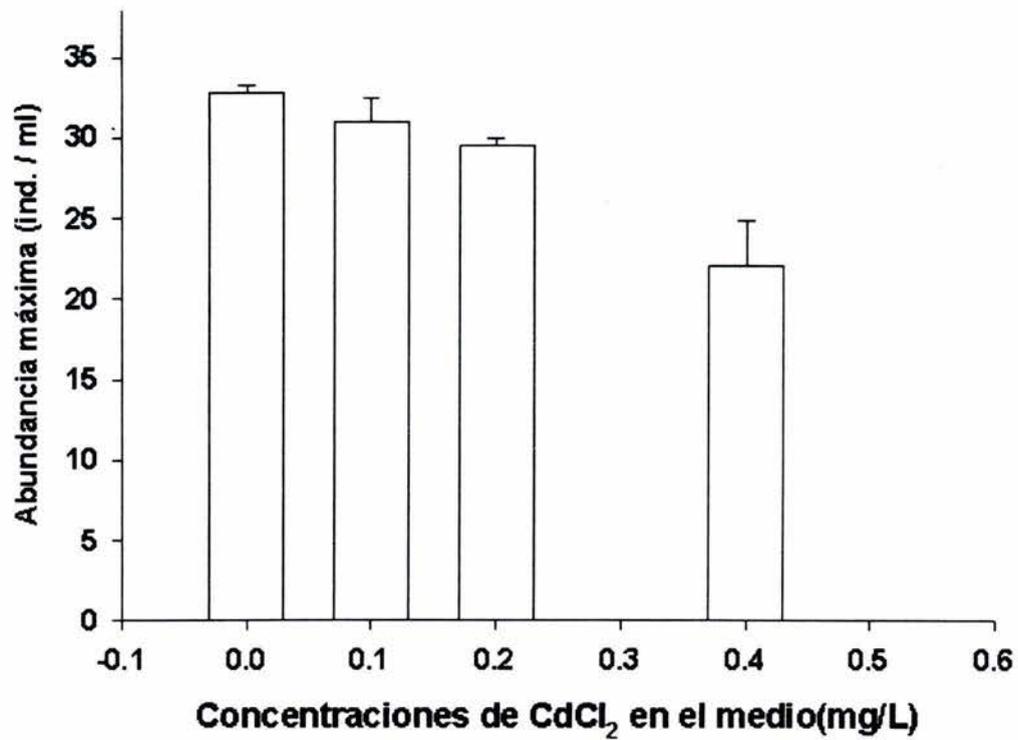
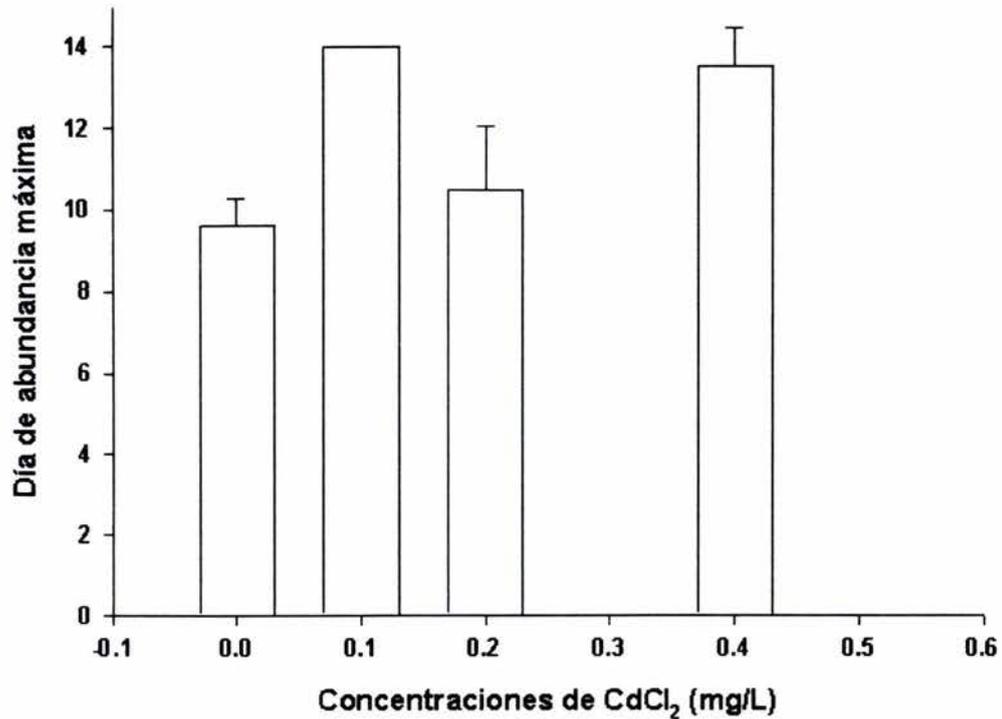


Figura 3. Densidad poblacional de *Brachionus rubens* expuesto a diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> en el medio, con una densidad de alga de  $0.5 \times 10^6$  cel/mL. Los valores representan los promedios y error estándar de tres réplicas.



**Figura 4.** Abundancia máxima de *Brachionus rubens* expuesto a diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> en el medio, con una densidad de alga de  $0.5 \times 10^6$  cel/mL. Las barras representan el promedio y el error estándar basados en tres réplicas.



**Figura 5. Día de abundancia máxima de *Brachionus rubens* expuesto a diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> en el medio, con una densidad de alga de  $0.5 \times 10^6$ . Las barras representan el promedio y el error estándar basados en tres réplicas.**

### **Efectos de CdCl<sub>2</sub> a través del alga en *B. rubens***

En cuanto a la tendencia en las pruebas de toxicidad por medio del alga cargada, se observó, que a mayor tiempo de exposición, el pico de la densidad poblacional varió de 38 ind/ml a 12 ind/ml en la muestra de 4 horas de exposición además de que decae la población en menos tiempo (Figura 6). El promedio de la abundancia máxima encontrada en el crecimiento poblacional de *Brachionus rubens* fue decreciendo conforme aumentaron las concentraciones del tóxico (Figura 7) y el día de abundancia máxima fue en promedio de 9.6 días, al igual que en el control (Figura 8).

Según las pruebas estadísticas realizadas, existe una diferencia significativa entre los valores de la tasa de crecimiento poblacional y los valores de máxima abundancia de los diferentes tratamientos, siendo menores , en ambos tratamientos, los valores a mayores horas de exposición (Figura 6).

**Tabla 3.** Resultados de análisis de varianza utilizando valores de abundancia máxima y tasa de crecimiento poblacional de *B. rubens* en relación con diferentes horas de exposición a CdCl<sub>2</sub>. Los valores mencionados son tratamiento, grados de libertad, suma de cuadrados, promedio de suma de cuadrados y relación de F.

Variación	GL	Sc	Psc	F
<b>Densidad poblacional maxima</b>				
Entre tratamientos	3	666.396	222.13	43.52***
Error	8	40.833	5.1	
<b>Tasa de crecimiento</b>				
Entre tratamientos	3	0.114	0.04	14.71***
Error	8	0.021	0	

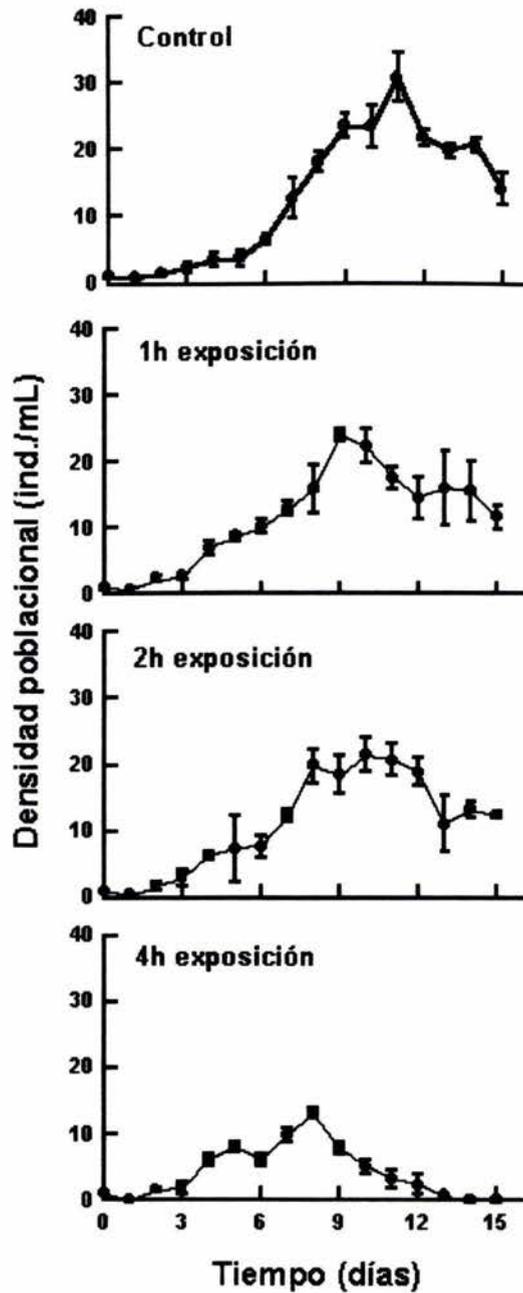
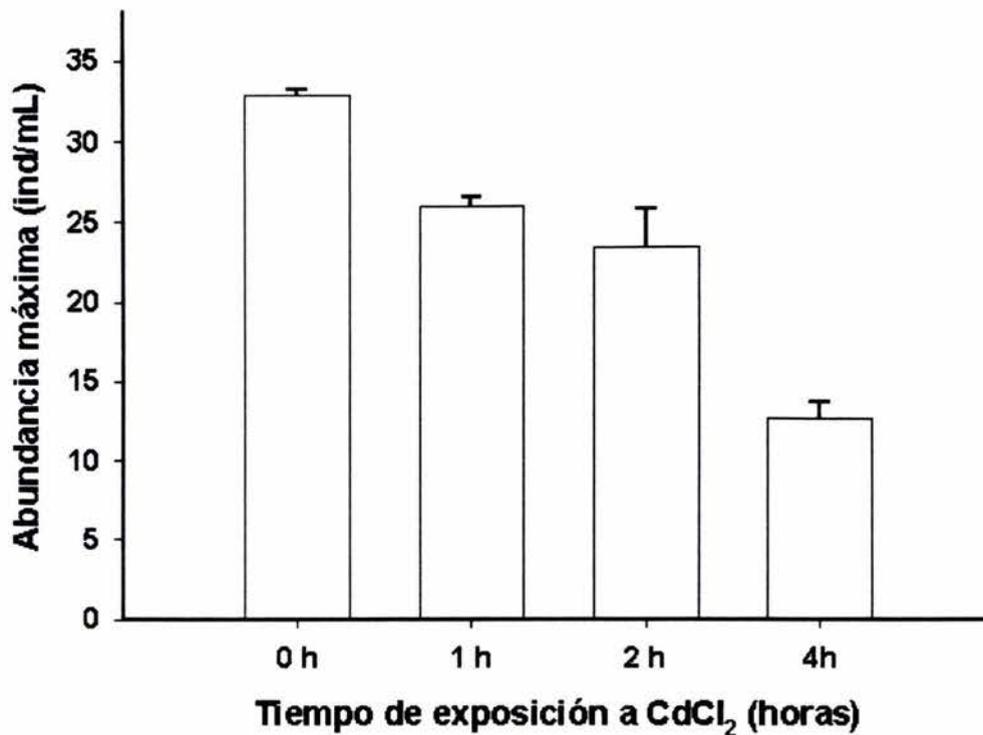
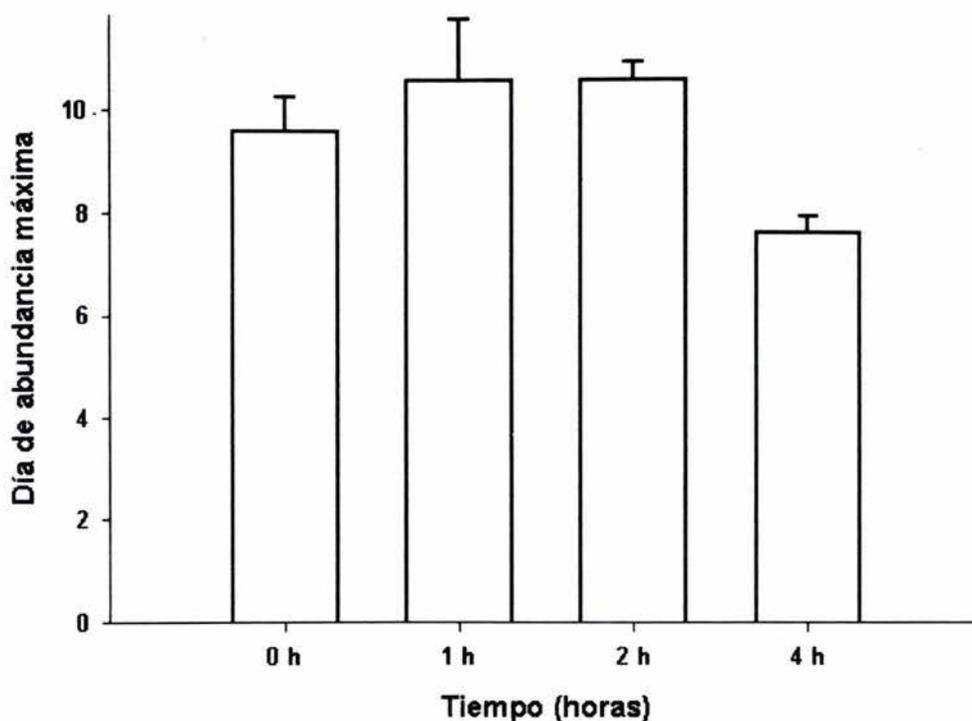


Figura 6. Densidad poblacional de *Brachionus rubens* expuesto a CdCl<sub>2</sub> por medio del alga cargada (*Chlorella vulgaris*, con diferentes periodos de exposición, a una densidad de  $0.5 \times 10^6$ ). Los valores representan el promedio y el error estándar basados en tres réplicas.



**Figura 7.** Abundancia máxima de *Brachionus rubens* expuesto a CdCl<sub>2</sub> por medio del alga cargada (*Chlorella vulgaris*, con diferentes periodos de exposición, a una densidad de  $0.5 \times 10^6$ ). Los valores representan el promedio y el error estándar basados en tres réplicas.



**Figura 8.** Día de abundancia máxima de *Brachionus rubens* expuesto a  $\text{CdCl}_2$  por medio del alga cargada (*Chlorella vulgaris*, con diferentes periodos de exposición, a una densidad de  $0.5 \times 10^6$ ). Los valores representan el promedio y el error estándar basados en tres réplicas.

### **Efectos del $\text{HgCl}_2$ en el medio sobre *B. rubens***

El mercurio disminuyó la respuesta poblacional del rotífero en forma significativa, siendo más notable el efecto a mayores concentraciones (Figura 9). En la concentración de 0.015mg/L del tóxico, el crecimiento poblacional fue mínimo y el decline poblacional comenzó a la mitad del periodo de estudio (aproximadamente al séptimo día) mientras que las otras poblaciones comenzaron a declinar de el día 13 en adelante, sin embargo, se observó en el tratamiento de 0.010 mg/L, que la población se resistió a decaer y se recuperó

un poco al final (Figura 9). Los valores de abundancia máxima obtenidos, también se vieron muy afectados por el incremento de las concentraciones del tóxico, pues éstos siempre fueron menores al control y disminuyeron a concentraciones más elevadas (Figura 10). El día de abundancia máxima del control fue el 11, mientras que en las muestras se dio entre los días 11, 9 y 6 (Figura 11).

De acuerdo con las pruebas estadísticas, (ANOVA y dist. de F) se observó que sí se encontró una diferencia significativa entre los valores de la tasa de crecimiento poblacional y de la densidad poblacional de los diferentes tratamientos, ya que a mayores concentraciones, éstos bajaron (Tabla 2).

**Tabla 4.** Resultados de análisis de varianza utilizando valores de abundancia máxima y tasa de crecimiento poblacional de *B. rubens* en relación con diferentes concentraciones de HgCl<sub>2</sub>. Los valores mencionados son tratamiento, grados de libertad, suma de cuadrados, promedio de suma de cuadrados y relación de F.

Variación	GL	Sc	Psc	F
<b>Densidad poblacional máxima</b>				
Entre tratamientos	3	1172.917	390.97	12.54***
Error	8	249.333	31.17	
<b>Tasa de crecimiento</b>				
Entre tratamientos	3	0.147	0.05	56.58***
Error	8	0.007	0.00	

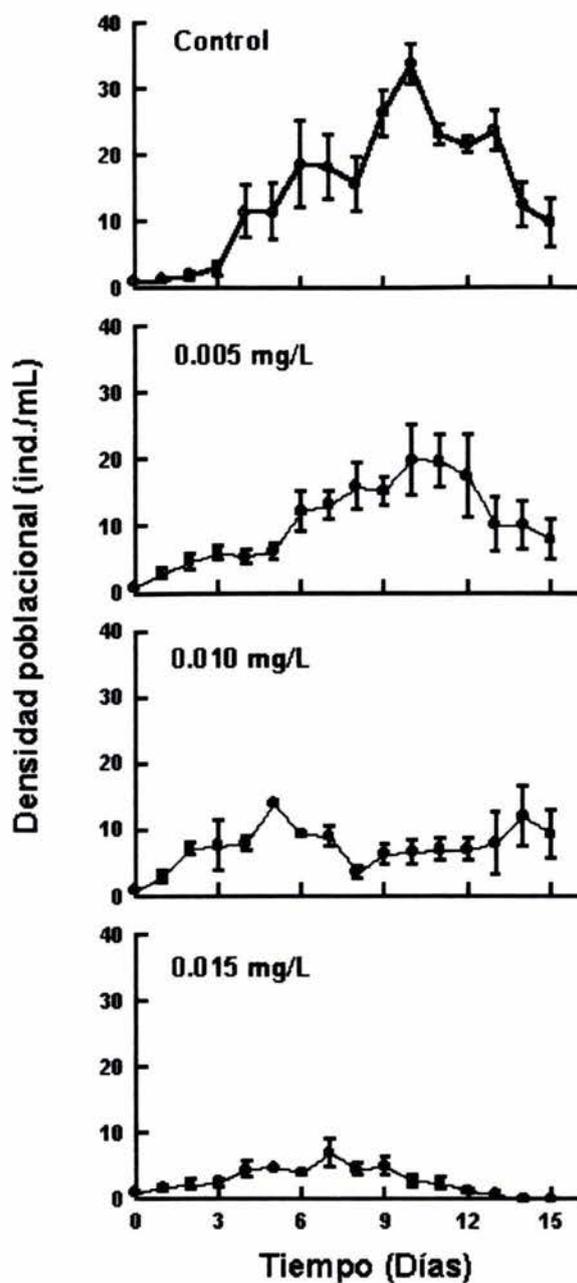


Figura 9. Densidad poblacional de *Brachionus rubens* expuesto a diferentes concentraciones de  $HgCl_2$  en el medio, con una densidad de alga de  $0.5 \times 10^6$ . Los valores representan el promedio y el error estándar basados en tres réplicas.

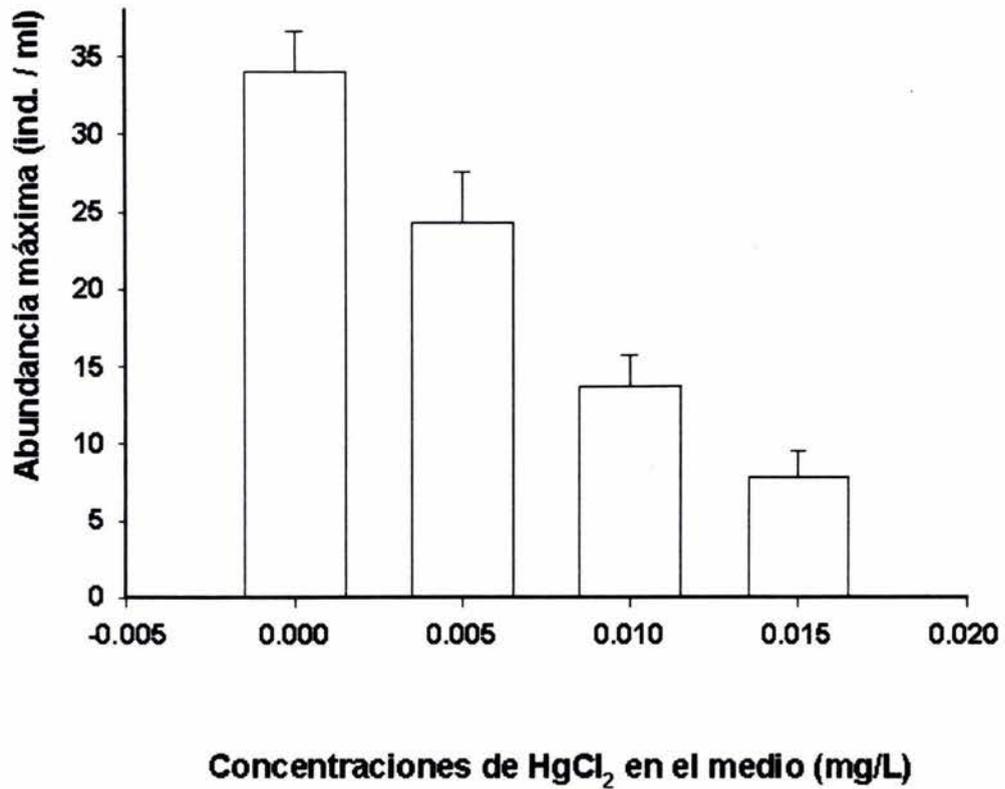
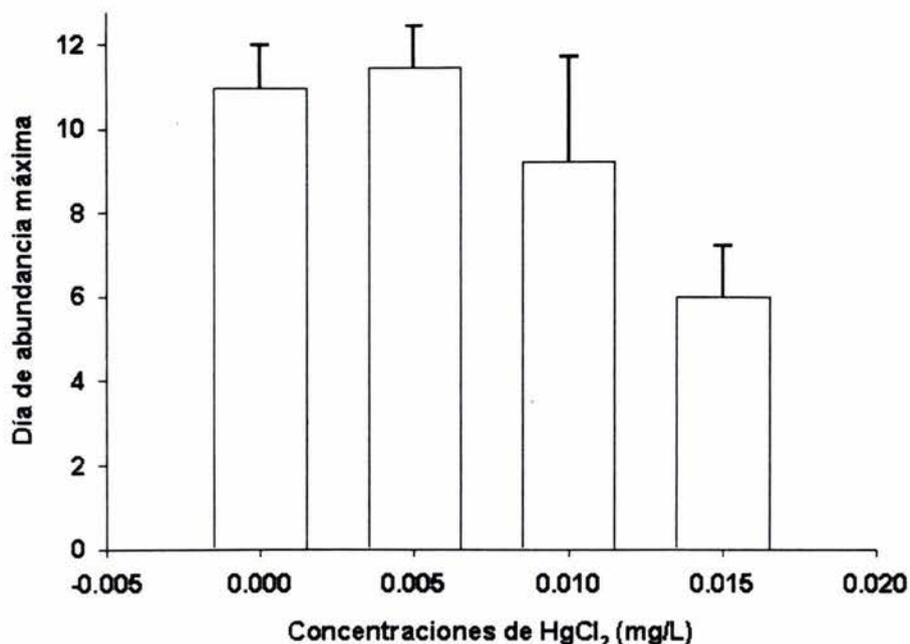


Figura 10. Abundancia máxima de *Brachionus rubens* expuesto a diferentes concentraciones de HgCl<sub>2</sub> en el medio, con una densidad de alga de  $0.5 \times 10^6$ . Los valores representan el promedio y el error estándar basados en tres réplicas.



**Figura 11.** Día de abundancia máxima de *Brachionus rubens* expuesto a diferentes concentraciones de HgCl<sub>2</sub> en el medio, con una densidad de alga de  $0.5 \times 10^6$ . Los valores representan el promedio y el error estándar basados en tres réplicas.

### **Efectos de HgCl<sub>2</sub> a través del alga en *B. rubens***

La toxicidad del Cloruro de Mercurio disminuyó drásticamente la densidad de *B. Rubens* en los tres tratamientos o diferentes horas de exposición al tóxico. La respuesta fue muy similar en los tres casos (1, 2 y 4 horas), pero varió de manera considerable con respecto al control (Figura 12) . En esta prueba, los valores de abundancia máxima se dieron antes en los tratamientos que en el control pero fueron mucho más bajos (Figura 13). En cuanto a las pruebas estadísticas, se obtuvo que existió una diferencia significativa en la tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) y la densidad poblacional entre los diferentes tratamientos (1, 2 y 4 horas). El día de abundancia máxima fue cinco días posterior al control

aproximadamente en el día diez mientras que en los tres tratamientos fue en el quinto día y ya no subió más.

**Tabla 5.** Resultados de análisis de varianza utilizando valores de abundancia máxima y tasa de crecimiento poblacional de *B. rubens* en relación con diferentes horas de exposición a HgCl<sub>2</sub>. Los valores mencionados son tratamiento, grados de libertad, suma de cuadrados, promedio de suma de cuadrados y relación de F.

Variación	GL	Sc	Psc	F
<b>Densidad poblacional máxima</b>				
Entre tratamientos	3	1526.167	508.72	53.32***
Error	8	76.333	9.54	
<b>Tasa de crecimiento</b>				
Entre tratamientos	3	0.213	0.07	344.71***
Error	8	0.002	0.00	

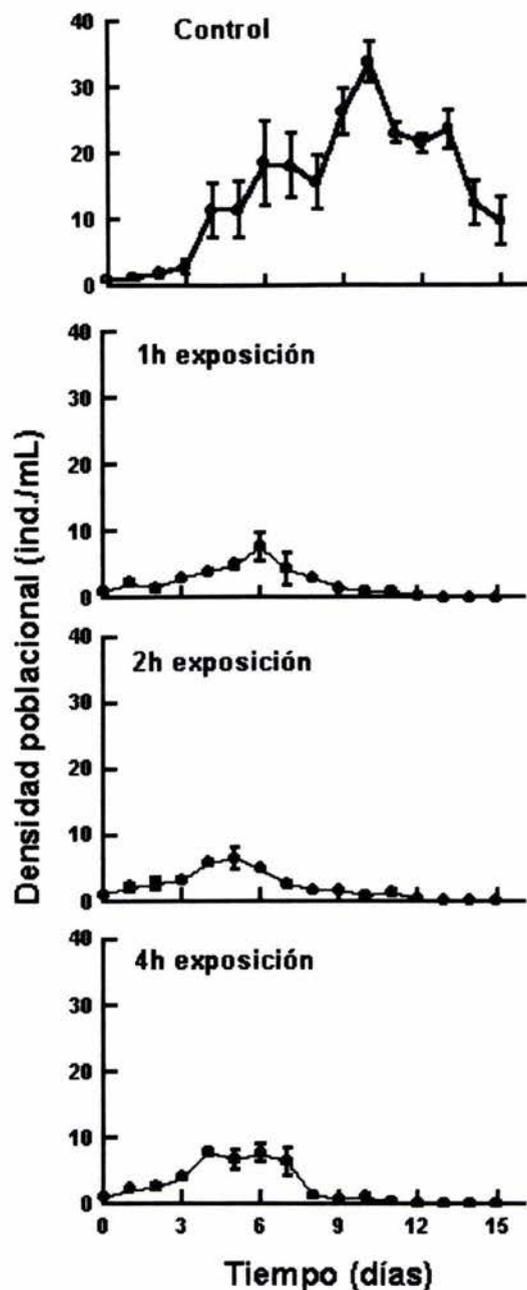


Figura 12. Densidad poblacional de *Brachionus rubens* expuesto a HgCl<sub>2</sub> por medio del alga cargada (*Chlorella vulgaris*, con diferentes periodos de exposición, a una densidad de  $0.5 \times 10^6$ ). Los valores representan el promedio y el error estándar basados en tres réplicas.

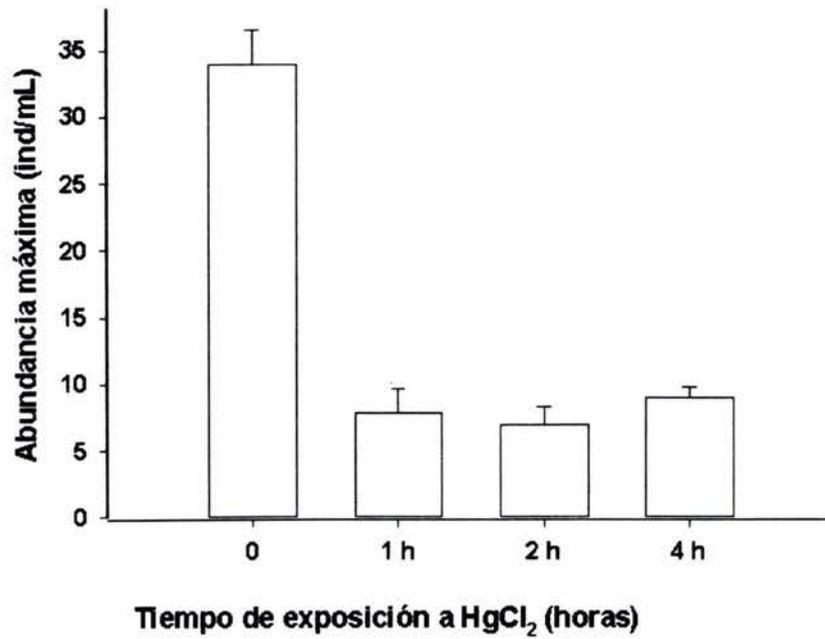
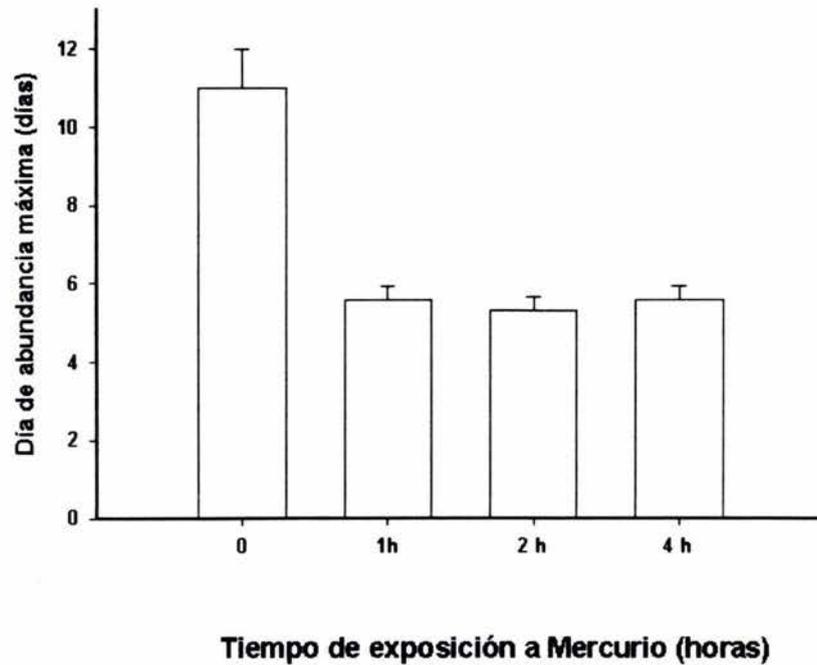


Figura 13. Abundancia máxima de *Brachionus rubens* expuesto a HgCl<sub>2</sub> por medio del alga cargada (*Chlorella vulgaris*, con diferentes periodos de exposición, a una densidad de  $0.5 \times 10^6$ ). Los valores representan el promedio y el error estándar basados en tres réplicas.



**Figura 14.** Día de abundancia máxima de *Brachionus rubens* expuesto a  $\text{HgCl}_2$  por medio del alga cargada (*Chlorella vulgaris*, con diferentes periodos de exposición, a una densidad de  $0.5 \times 10^6$ ). Los valores representan el promedio y el error estándar basados en tres réplicas.

## DISCUSIÓN

Los estudios de concentración letal media, son necesarios para determinar la concentración en la cual muere el 50% de los individuos iniciales. Los resultados de esta prueba son muy variables dependiendo de la especie de la que se trate o del tóxico que se utilice y es muy importante realizarla pues es muy posible que una sustancia tóxica pueda ser letal sólo cuando la dosis es muy alta, pero produzca efectos malignos a concentraciones relativamente bajas (Duffus, 1983). La concentración letal media en *Brachionus rubens*, resultó ser 24 veces más tóxico en el caso del mercurio que en el del cadmio, lo cual era de esperarse ya que existen varios estudios de toxicidad que comprueban que el mercurio, en la mayoría de las especies, es mucho más tóxico que el cadmio (Laws, 1993). Es importante resaltar, que las pruebas de toxicidad aguda se realizan en ausencia de alimento, mientras que en las de toxicidad crónica el alimento es necesario para observar la reproducción (Sarma, 2000).

Los metales pesados en los cuerpos de agua afectan tanto la reproducción como la supervivencia de rotíferos como *Asplanchna*, *Brachionus* y *Keratella* (McDaniel y Snell, 1999). En este estudio se comprobó la afirmación de estos autores, pues tanto la tasa de incremento poblacional al día como la densidad poblacional de *B. rubens*, se vieron muy afectadas con el cadmio y con el mercurio ya que “r” varió de forma estadísticamente significativa de 0.33 en el control, a 0.02 bajo los tratamientos; y en la  $A_{max}$  se observó que conforme las concentraciones de los metales pesados fueron aumentando los valores

disminuyeron significativamente, lo cual confirma los resultados observados en varios estudios anteriores de ecotoxicología en zooplancton (Sarma y col , 2001).

Los metales pesados en el ambiente pueden afectar por diferentes vías, es decir, dependiendo de la ruta de exposición, la toxicidad de los metales pesados puede variar. En el presente estudio, la población de *B. rubens* se vió más afectada con el mercurio suministrado a través del alga que en el agua. En las muestras con el tóxico en el medio, se presentaron varios picos en las curvas de densidad poblacional, lo cual quiere decir que la población se recuperaba, aunque volvía a decaer. En contraste, en las curvas obtenidas en las gráficas del alga cargada, una vez que alcanza su máxima abundancia (siempre menor), la población decae y no vuelve a subir. Probablemente esto se debe a que una parte del tóxico que se suministra en el medio, es adsorbido por las algas (Mehta y col. 2000) y la otra parte sigue presente en el medio pero dependiendo de la biomasa de algas, el tóxico disminuye más o menos del ambiente. Según Pickardt (2002), esto es posible ya que él observó 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. También es cierto que si los metales se encuentran en el agua y en el alimento, el organismo es intoxicado por dos vías, aunque en este caso, la diferencia fue poco notable debido a que el alimento es rápidamente ingerido por los rotíferos. Por otro lado, es difícil medir o cuantificar el tóxico en las células de las algas, por lo cual se decidió no incluir un estudio de toxicidad aguda del alga cargada pero, aún cuando no medimos la cantidad de metal pesado presente en cada célula de *Chlorella*, mantuvimos constantes los diferentes tiempos de exposición. Se observó también en las pruebas de toxicidad crónica con el alga expuesta a ocho veces la

concentración letal cincuenta de cada metal, que el mercurio fue siempre más tóxico que el cadmio.

Woodwell (1967), realizó un experimento que demostró el fenómeno de la biomagnificación, midiendo la concentración de tóxico presente en diferentes niveles de la cadena trófica alcanzando una concentración de 80 veces más alta en peces que en el primer nivel trófico o inclusive que en el agua (Laws, 1993) lo cual también, nos ayuda a comprender que la tasa poblacional se vea mayormente afectada en las algas expuestas previamente al tóxico.

Diferentes investigadores han demostrado que las algas pueden retener una buena parte de los metales presentes en el medio con muy pocas horas de exposición (García, 1993). En el caso del cadmio, el tóxico fue más nocivo en la última hora de exposición que en la primera, a diferencia del mercurio que fue igualmente tóxico desde la primera hora de exposición. Se ha demostrado que los organismos del zooplancton, reducen su alimentación en presencia de tóxicos en comparación con los controles (Lampert y Sommer, 1997). En el presente trabajo fue posible observar una influencia negativa en la población con el tóxico en el alga desde la primera hora de exposición. El periodo de exposición y concentración de metales pesados utilizados con el alga *Chlorella vulgaris* no las mata, pues las células de las algas son mucho más resistentes que el zooplancton (Kerrison, 1988).

En el caso del cadmio, la tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) disminuyó significativamente y la abundancia máxima ( $A_{\max}$ ) se redujo al incrementarse la concentración del cadmio en el medio. Asimismo, al aumentar el tiempo de exposición del alga al cadmio, “ $r$ ” disminuyó

significativamente, al igual que  $A_{\max}$ . En cuanto al mercurio, el valor de "r" tuvo una disminución estadísticamente significativa. El valor de  $A_{\max}$  también disminuyó al incrementarse la concentración del mercurio en el medio. Los valores de "r" y  $A_{\max}$  disminuyeron significativamente al aumentar el tiempo de exposición del alga al mercurio.

## CONCLUSIONES



Evaluando toxicidad aguda y crónica, se concluye que *B. rubens* fue más sensible al  $\text{HgCl}_2$  que al  $\text{CdCl}_2$ .

### IZT.

El valor de la concentración letal media de  $\text{HgCl}_2$  resultó 24 veces menor en *Brachionus rubens*, que la del  $\text{CdCl}_2$  en la misma especie.

El crecimiento poblacional de *Brachionus rubens* fue afectado por ambos metales a través del medio y a través del alga cargada.

La tasa de incremento poblacional de *B. rubens* es inversamente proporcional a la concentración de ambos tóxicos.

El día de abundancia máxima de *B. rubens* se retarda en presencia de los tóxicos.

La abundancia máxima de *B. rubens* se ve afectada en presencia de los tóxicos.

En el caso del cadmio en el alga, el efecto tóxico sobre el crecimiento poblacional de *B. rubens* fue mayor en la cuarta hora de exposición, que en la primera.

En el caso del mercurio en el alga, el efecto tóxico sobre el crecimiento poblacional de *B. rubens* fue igualmente nocivo desde la primera, hasta la última hora de exposición.

## APÉNDICES

### Apéndice A

El **medio EPA** se prepara disolviendo 95mg de  $\text{NaHCO}_3$ , 60mg de  $\text{CaSO}_4$ , 60mg de  $\text{MgSO}_4$  y 4mg de  $\text{KCl}$  por litro de agua destilada.

### Apéndice B

El **medio Bold** se compone mezclado 3ml de cada uno de los siguientes elementos traza:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{EDTA} + \text{KOH}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaNO}_3$  en 2000ml de agua destilada.

## REFERENCIAS

- Anónimo, 1985. Methods of measuring the acute toxicity of effects to fresh water and marine organisms. US Environment Protection Agency EPA/600/4-85/013, Washington DC.
- Borowitzka, M.A., y Borowitzka, L.J. 1988 Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press. London.
- Boraas M. E, 1993. The Growth of *Brachionus rubens* in Semicontinuous Culture. Norbert Walz (Ed). Ecological studies 98.p.p.41-50
- Bryan, G.W., 1976. Heavy metals contamination in the sea. Marine Pollution, Academic Press, London, 302.
- Buikema AL Jr, Cairns JJr, Sullivan GW., 1974. Rotifers as monitors of heavy metal pollution in water. Va Polytech Inst St Univ Wat Resour Res Cent Bull 71: 1-74.
- Calow P., 1993 (ed) Handbook of ecotoxicology. Blackwell Sci Publ. London.
- Cañizares-Villanueva, F. Martínez-Jerónimo, 1999, Acute Toxicity to *Daphnia magna* of Effluents Containing Cd, Zn and a Mixture Cd-Zn, after Metal Removal by *Chlorella vulgaris*.
- Duffus J.H., 1989. Toxicología Ambiental. Ed. Omega. 11-29
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge Univ. Press, London.
- García, E.M., 1993. The ability of the unicellular giant alga *Acetabularia* sp. To bioconcentrate aquatic mercury in whole and anucleated cells. Toxicol. Environ. Chem. 39: 29-35.

- Gonzalez F., 2002. Mercury in a Marine Trophic Chain. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 68: 448-454.
- Hatakeyama, S; Yasuno, M., 1981. Effects of Cadmium Accumulated Chlorella on the reproduction of *Moina macrocopa* (Cladocera). Ecotoxicol. Environ. Saf. 5: 341-350
- Hawkins, P.R. y Griffiths, D.J., 1987. Copper as an algicide in atropical resrvoir. Water Res.21,475-480.
- Henriette S., 2002. Comparing Sensitivity of Ecotoxicological Effect Endpoints between Laboratory and Field. Ecotoxicology and Environmental Safety 52, 97-112.
- Hutchinson, G.E., 1967. A treatise on limnology. Introduction to the lake biology and the limnoplankton. Vol. 2, John Wiley & sons, New York, pp. 1115.
- Karl O.R., 1993. Steady-State Growth and Carbon Metabolism of *Brachionus rubens* and *B. calciflorus*. Norbert Walz (Ed). Ecological studies 98.p.p.124-132.
- Krebs, C.J. 1985., Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance. Harper and Row, New York.
- Lampert W & Sommer U 1997., Limnoecology: The ecology of lakes and streams. Oxford University Press, New York 382 pp.
- Laws A. Edward, 1993. Aquatic Pollution. Interscience Publication. pp.8-10, 352-356.
- Madsen, K.N. (1992) Effects of arsenic and survival and metabolism of *Cragnon cragnon*. Mar, Biol.,113, 37-44.
- Margalef R., 1983. Linmología. Ed. Omega. Barcelona, España.
- Méndez L. Y., 2002. Heavy Metals in Clams from Guaymas Bay, México. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 68: 217-223.

- Nogrady, T., Wallace, R.L. y Snell, T.W. 1993. Rotifera. Volume 1: Biology, Ecology and Systematics. SPB Academic Publishing bv. 12 pp.
- Pickhardt P.C., Carol L. Folt. , 2002 Algal blooms reduce the uptake of toxic methylmercury in freshwater food webs. Ecology. Vol:99.no.7. 4419-4423.
- Pennak R.W., Fresh-Water invertebrates of the United States., Interscience publication.pp. 169-170.
- Sarma S.S.S., T. Ramírez P., S. Nandini., 2000 Comparision of the sensitivity of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus*(Rotifera) to selected Heavy Metals Under Low and High Food (*Chlorella vulgaris*) Levels. Environ. Contam. Toxicol. 64:735-739.
- Sarma S.S.S., 2000. The use of rotifers for ecotoxicological studies in Mexico.Estudios sobre plancton en México y el Caribe. pp. 8, 9, 10.
- Sarma S.S.S. Nandini S. & Araiza M.A.F., 1998 Effect of methyl parathion-treated prey (*Brachionus calyciflorus*) on the population growth of the predator *Asplanchna sieboldi* (Rotifera). Bull. Environ. Contam.Toxicol. 61 (1): 135-142.
- Sarma, S.S.S., 1991. Rotifers and aquaculture(Review). Environ. Ecol. 9:414-428.
- Sarma, S.S.S., S. Nandini, 1999. Rotifer ecotoxicology. Laboratory manual. UNAM Campus Iztacala. 181pp.
- Snell, T.W., Childress, M.J; Boyer, E.M y Hoff, F.H., 1987. Assesing the status of rotifer mass cultures. J. World. Aquacult. Soc. 18: 270-277.
- Travieso, R. O. Cañizares, 1999. Heavy Metal Removal by Microalgae. Environment Contamination Toxicology. 62:144-151.

- Vega Quintero, M. S. 1996. Caracterización y análisis bromatológico de una cepa monoalgal: *Chlorella vulgaris* Beijerinck colectada de la atmósfera con posible uso en acuacultura. Tesis de Licenciatura UNAM, ENEP Iztacala
- Vilaclara, G. y Sládeček, 1989. Mexican rotifers as indicators of water quality with description of *Collotheca riverain*. Sp. Arch.Hydrobiol.115:257-263.
- Wetzel, R.G., 1981. Limnología. Omega. Barcelona.
- Wong, P.T.S., 1987. Cadmium in the Aquatic Environment. Wiley-Interscience Publication. National Water Research Institute, Canada. pp.121,122