

**UNIVERSIDAD
MICOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA**



**ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL FeSO_4 Y LA INFLUENCIA DE pH
ÁCIDOS SOBRE UN BIOINDICADOR DE ECOSISTEMAS SALINOS (*Artemia
franciscana*)**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTADA POR:
CARLOS IVÁN CARRANZA CARDOSO
DIRIGIDA POR:
D.C. MA. CARMEN BARTOLOMÉ CAMACHO**

MORELIA, MICHOACÁN

FEBRERO DE 2018

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de tesis a Dios y a mis padres. A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar; a mis padres Rafael y Verónica, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. Es por ellos, que soy lo que soy ahora. Los amo con mi vida.

A mis hermanos Alfonso y Marcos, que siempre me han apoyado en todo momento, muchas gracias por su amistad y cariño, los quiero mucho.

A mis familiares, por sus consejos, apoyo y motivarme a terminar este trabajo, me es complicado poder nombrarlos a todos en tan poco espacio, pero todos y cada uno de ustedes saben que los quiero mucho; muchas gracias por todo.

Así como también se la dedico a mis amigos que me acompañaron en mi etapa profesional; por su apoyo incondicional, paciencia, amistad y confianza. Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre Verónica

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor; por cultivar e inculcar ese sabio don de la responsabilidad. ¡Gracias por darme la vida! ¡Te quiero mucho!

A mi padre Rafael

A quien le debo todo en la vida, le agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo que me brindó para culminar mi carrera profesional. Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante, por su apoyo moral y económico, y por su amor.

A mis hermanos Alfonso y Marcos

Porque siempre he contado con ellos para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido; por el apoyo, amistad y cariño. ¡Gracias!

A mis familiares

Gracias a todos que directamente me apoyaron y aconsejaron para que este trabajo saliera adelante. ¡Los quiero mucho!

A mis maestros

Gracias por su tiempo, por su apoyo, así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional, algunos excelentes, otros quizás no; sin embargo, todos y cada uno de ustedes aportaron de alguna u otra manera su experiencia y conocimientos. ¡Mis respetos para todos!

A mi asesora

Infinitas gracias a la Dra. Carmen por haber confiado en mí, por su apoyo y asesoramiento en este proyecto. Le agradezco su tiempo y paciencia; así como también sus consejos y su amistad. La admiro por su labor académica, pero como persona mis respetos. Muchas gracias por todo.

A mis sinodales

Muchas gracias por sus consejos para mejorar mi trabajo y por su tiempo que dedicaron a éste; los admiro y respeto a todos.

A mis amigos

Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos. La lista es muy grande para nombrarlos

a todos, así es que les agradezco de corazón su amistad, confianza y apoyo. ¡Los quiero mucho!

Muchas gracias a todas las personas que intervinieron de alguna u otra manera para la realización de mi tesis profesional.

Esto apenas comienza...

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	VI
GLOSARIO	VII
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 CALIDAD DE LAS AGUAS	8
2.1.1 Parámetros de calidad	9
2.1.2 Turbidez	10
2.1.3 Oxígeno	10
2.1.4 pH	10
2.2 AGUAS RESIDUALES.....	12
2.3 ECOSISTEMAS ACUÁTICOS	14
2.4 CONTAMINACIÓN POR METALES	16
2.4.1 Contaminantes metálicos más importantes	23
2.4.2 Las dianas de toxicidad de los metales	25
2.5 IDENTIDAD E IMPACTO DEL HIERRO EN EL MEDIO ACUÁTICO Y SU MECANISMO DE ACCIÓN	27
2.5.1 La toxicidad del hierro	29
2.5.2 Sulfato ferroso (FeSO ₄).....	33
2.5.2.1 Efectos en la salud por contaminación con sulfato ferroso.....	35
2.6 INFLUENCIA DEL pH EN EL MEDIO ACUÁTICO.....	35
2.6.1 Dureza del agua.....	36
2.6.2 Solubilidad de nutrientes en función del pH.....	37
2.6.3 Relación del pH con los organismos acuáticos.....	37
2.7 ECOTOXICOLOGÍA Y LOS ENSAYOS BIOLÓGICOS	40

2.8 PRUEBAS DE TOXICIDAD ACUÁTICA	46
2.8.1 Toxicidad aguda.....	47
2.8.2 Toxicidad crónica	47
2.9 BIOINDICADORES Y SU IMPORTANCIA.....	48
2.9.1 Plancton.....	50
2.10 ARTEMIA FRANCISCANA	53
2.10.1 Ecología y distribución	53
2.10.2 Morfología y ciclo de vida	54
2.10.3 Morfología y metabolismo de los quistes	59
2.11 BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA EN <i>A. franciscana</i>	62
2.12 LEGISLACIÓN	65
3. JUSTIFICACIÓN	67
4. HIPÓTESIS.....	68
5. OBJETIVOS	68
5.1 OBJETIVO GENERAL	68
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	68
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	69
6.1 PREPARACIÓN DE AGUA MARINA SINTÉTICA	69
6.2 MATERIAL BIOLÓGICO	70
6.3 SUSTANCIA EMPLEADA EN EL BIOENSAYO.....	71
6.4 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL FeSO ₄ EN NAUPLIOS DE <i>Artemia franciscana</i>	71
6.4.1 Distribución de nauplios de <i>Artemia</i>	71
6.4.2 Exposiciones previas	72
6.4.3 Exposiciones finales	74
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
8. RESULTADOS	75
8.1 COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE CL ₅₀ A 24h CON RESPECTO A LAS VARIACIONES DE pH.....	80
9. DISCUSIÓN	83

10. CONCLUSIONES	89
11. RECOMENDACIONES.....	90
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contaminantes presentes en aguas residuales y sus consecuencias ecológicas, estéticas y en la salud humana.....	14
Tabla 2. Factores que afectan a la toxicidad de los metales pesados disueltos	21
Tabla 3. Factores que afectan la especiación química y que influyen en la toxicidad de los metales en el ambiente acuático	22
Tabla 4. Niveles de tolerancia a metales	23
Tabla 5. Parámetros para una óptima eclosión de nauplios de <i>A. franciscana</i>	70
Tabla 6. Índices de toxicidad a 24h de exposición con sulfato ferroso a pH 4.5.....	76
Tabla 7. Índices de toxicidad a 24h de exposición con sulfato ferroso a pH 5.5.....	77
Tabla 8. Índices de toxicidad a 24h de exposición con sulfato ferroso a pH 6.5.....	78
Tabla 9. Índices de toxicidad obtenidos a pH control (8.5)	79
Tabla 10. Resultados de ANOVA de la comparación de CL ₅₀ del pH control con respecto a las variaciones de pH.....	81
Tabla 11. Valores comparativos de la CL ₅₀ utilizando <i>Daphnia magna</i> expuesta al FeSO ₄	85

ÍNDICE DE FIGURAS, DIAGRAMAS Y GRÁFICOS

Figura 1. Contaminación del medio acuático.....	5
Figura 2. Biomagnificación y bioacumulación de tóxicos.....	6
Figura 3. Eutrofización.....	9
Figura 4. Representación del ecosistema acuático.....	16
Figura 5. Metales esenciales y tóxicos.	18
Figura 6. Principales destinos y fuentes de emisión de metales en el ambiente.....	19
Figura 7. Entrada e incorporación de los metales en la célula.....	20
Figura 8. Representación de las diferentes dianas biológicas de los metales... ..	26
Figura 9. Sulfato ferroso.	35
Figura 10. Clasificación del plancton	50
Figura 11. Fitoplancton	52
Figura 12. Zooplancton.....	52
Figura 13. Desarrollo del quiste de <i>Artemia</i> desde la incubación en agua marina hasta la liberación del nauplio	55
Figura 14. Diferencias morfológicas entre macho y hembra de <i>Artemia</i>	57
Figura 15. Huevos fecundados de <i>Artemia</i>	58
Figura 16. Reproducción ovípara u ovovivípara de <i>Artemia</i>	58
Figura 17. Esquema de la ultraestructura de un quiste de <i>Artemia</i>	60
Figura 18. Diagrama esquemático del efecto de las temperaturas del agua sobre el metabolismo del quiste de <i>Artemia</i>	62
Figura 19. Placas de cultivo celular de 24 pocillos.....	72
Figura 20. Nauplios muertos de <i>Artemia franciscana</i> observados en el estereoscopio.	73

Diagrama 1. Ciclo de vida de <i>Artemia franciscana</i>	59
Diagrama 2. Metodología para preparar el agua marina reconstituida.	69
Gráfico 1. Curva Concentración-Respuesta del FeSO_4 a 24h de exposición sobre <i>Artemia franciscana</i> en pH 4.5	76
Gráfico 2. Curva Concentración-Respuesta del FeSO_4 a 24h de exposición sobre <i>Artemia franciscana</i> en pH 5.5	77
Gráfico 3. Curva Concentración-Respuesta del FeSO_4 a 24h de exposición sobre <i>Artemia franciscana</i> en pH 6.5	78
Gráfico 4. Curva Concentración-Respuesta del FeSO_4 sobre <i>A. franciscana</i>	80
Gráfico 5. Comparación de las CL_{50} obtenidas a pH control con respecto a las variaciones de pH a 24h de exposición con FeSO_4	82

ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de Varianza

CL_{max}: Concentración Letal máxima

CL_{min}: Concentración Letal mínima

CL₅₀: Concentración Letal media

CMA: Colorado Mining Association

EPA: Environmental Protection Agency

FAO: Food and Agriculture Organization

Fe: Hierro (Elemento químico)

ICSU: International Council for Science

IPCS: International Programme on Chemical Safety

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

NOEC: Concentración de Efectos No Observables

NPDES: National Pollutant Discharge Elimination System

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

pH: potencial de Hidrógeno

PNUMA: Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente

SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

GLOSARIO

Agua reconstituida: Agua preparada con reactivos establecidos, con el fin de generar las condiciones ambientales presentes en los ecosistemas en los cultivos mantenidos en el laboratorio.

Aguas residuales: Las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, agrícolas, pecuarias, domésticos y similares, así como la mezcla de ellas.

Agudo: Exposiciones o efectos a corto plazo. En toxicología experimental, estudios de corta duración, normalmente de 24h, o de dos semanas o menos, iniciados por la administración de una dosis única.

Antropogénico: Causado o influido por actividades humanas.

Bioacumulación: Se refiere al proceso de almacenamiento de un contaminante en un organismo o una comunidad biológica debida a la captación directa desde el agua y/o por ingestión.

Bioconcentración: Es el proceso por el cual los organismos, especialmente los acuáticos, pueden absorber y concentrar sustancias, directamente del medio que les rodea, a través de su superficie respiratoria y de su piel.

Biodisponibilidad: Es un término que indica la velocidad y la cantidad de alguna sustancia que alcanza intacta a la circulación general de cualquier ser vivo.

Bioensayo: Procedimiento para evaluar la actividad biológica, la presencia o la cantidad de una sustancia (tóxico, toxina, hormona, antibiótico, etc.) mediante la medida de sus efectos sobre un organismo o cultivo celular en comparación con una preparación estándar apropiada.

Biomagnificación: Se define como la acumulación y la transferencia de sustancias a través de la cadena alimenticia, produciéndose un aumento de las concentraciones internas en los organismos situados en los niveles más altos de la cadena trófica.

Biomarcador (Bioindicador): Parámetro que puede utilizarse para identificar un efecto tóxico en un organismo, y puede permitir la extrapolación interespecies. Indicador que señala un acontecimiento o una situación en una muestra o sistema biológico y proporciona una medida de la exposición, el efecto o la susceptibilidad.

Cadena trófica: También llamada cadena alimentaria, es la secuencia de transferencia de materia y energía en forma de alimento de organismo en organismo en niveles tróficos ascendentes o descendientes.

Carcinogénico: Es un agente físico, químico o biológico potencialmente capaz de producir cáncer al exponerse a tejidos vivos.

Concentración: Cantidad de una sustancia, expresada en peso o en moles (S), por unidad de peso o volumen del medio en que se encuentra ($C=S/Kg$; $C=S/L$). Puede expresarse como porcentaje (riqueza). No es sinónimo de dosis.

Concentración Letal Media (CL₅₀): Concentración, calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que se espera que mate al 50% de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas.

Contaminante: Sustancia ajena, presente en un sistema natural en una concentración más elevada de lo normal por causa de actividad antrópica directa o indirecta. En un sentido más amplio se le define como la presencia de cualquier agente físico, químico o biológico, o de combinaciones de los mismos en lugares, formas y concentraciones tales y con tal duración que sean o puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o bienestar de la población, o perjudiciales para la vida animal y vegetal, o que impidan el uso y goce de las propiedades y lugares de recreación.

Control: Sustancia o preparación conocida que se utiliza como referencia o testigo en las determinaciones cualitativas y cuantitativas, para detectar interferencias o errores analíticos.

Crónico: Ocurre durante un periodo relativamente largo de exposición (una porción significativa de la vida del organismo >10%).

Curva concentración-respuesta: Gráfico que relaciona la concentración de la exposición y la proporción de individuos de la población que manifiesta un efecto determinado.

Ecosistema: Entidad funcional constituida por todos los organismos (microorganismos, animales y plantas) que viven en un área natural determinada y que interaccionan mutuamente y con los componentes físicos y químicos de su ambiente; es la unidad estructural y funcional en ecología.

Ecosistema acuático: Es la unidad funcional básica de interacción de los organismos vivos entre sí y de estos con el ambiente acuático en un espacio y tiempo determinado, que puede ser cualquier cuerpo de agua, como: mares, océanos, ríos, lagos, pantanos y demás fuentes. Los dos tipos más destacados son: los ecosistemas marinos y los ecosistemas de agua dulce.

Ecotoxicología: Estudio de los efectos tóxicos de los agentes físicos y químicos sobre las poblaciones y comunidades de los ecosistemas; abarca las formas de transferencia de estos agentes y sus interacciones con el ambiente. La Ecotoxicología prospectiva evalúa la toxicidad de las sustancias antes de su producción y uso. La Ecotoxicología retrospectiva se ocupa de confirmar si la sustancia produce daños en el ecosistema.

Efluente: Líquido, sólido o gas emitido o descargado desde una fuente al medio ambiente.

Ensayo de toxicidad: Estudio experimental de los efectos adversos de una sustancia sobre un organismo vivo, durante un tiempo determinado y condiciones definidas. Mide las proporciones de organismos afectados (efecto cuantitativo) o el grado de efecto (graduado) luego de la exposición a la muestra.

Ensayo de toxicidad aguda: Estudio experimental para determinar los efectos adversos que pueden aparecer en un corto tiempo (usualmente dos semanas) después de una dosis única de una sustancia, o de varias dosis administradas en 24h.

Factores Abióticos: Son los distintos componentes que determinan el espacio físico en el cual habitan los seres vivos; entre los más importantes podemos encontrar: el agua, la temperatura, la luz, el pH, el suelo, la humedad, el oxígeno y los nutrientes.

Factores Bióticos: Son todos los organismos que tienen vida. Pueden referirse a la flora, la fauna, de un lugar y sus interacciones.

Genotóxico: Es la capacidad para causar daño al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos; el daño en el material genético incluye no sólo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula.

Grupo control: Grupo seleccionado o establecido necesariamente antes de un estudio, integrado por humanos, animales, células, etc., en todo idéntico al grupo que se estudia, y mantenido en la misma situación y condiciones que éste, pero sin someterlo a la exposición.

Lixiviación: Fenómeno de desplazamiento de sustancias solubles o dispersables (arcilla, sales, hierro, humus) causado por el movimiento de agua en el suelo, y es, por lo tanto, característico de climas húmedos. Esto provoca que algunas capas del suelo pierdan sus compuestos nutritivos, se vuelvan más ácidas y a veces también se origine toxicidad.

Mutagénico: Es cualquier agente físico, químico o biológico que altera o cambia la información genética (usualmente ADN) de un organismo y ello incrementa la frecuencia de mutaciones por encima del nivel natural.

Nauplio: Es la primera etapa de desarrollo de un crustáceo y abarca desde que emerge del huevo hasta la primera muda.

pH: Potencial de Hidrógeno, mide la concentración de iones hidronio presentes en el agua. Indica la acidez y/o basicidad del agua.

Quiste: Es un estado de desarrollo embrionario en etapa de gástrula, protegido por una cubierta constituida por tres estructuras; corión, membrana cuticular externa y cutícula embrionaria.

Respuesta: Proporción (porcentaje) de población expuesta que experimenta un determinado efecto o proporción de un grupo de individuos que manifiesta un efecto concreto, tras una dosis determinada y un tiempo dado.

Teratogénico: Es una sustancia, agente físico o químico u organismo capaz de provocar un defecto congénito (malformación) durante la etapa reproductiva de algún organismo.

Toxicidad: Es la capacidad de una sustancia para causar algún efecto nocivo sobre un organismo vivo. Se debe hacer referencia a la cantidad administrada o absorbida (dosis o concentración), la vía (inhalación, ingestión, inyección, etc), distribución en el tiempo (dosis simple, múltiple), naturaleza y severidad del daño producido y el tiempo necesario para producir el efecto.

Toxicidad aguda: Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos dentro de un corto plazo de tiempo (usualmente hasta 14 días) después de la administración de una dosis única (o una exposición dada) o tras dosis o exposiciones múltiples en 24h.

Tóxico: Es cualquier sustancia pura o combinada que, al entrar en contacto con un organismo, produce daños estructurales, alteraciones bioquímicas o fisiológicas o incluso la muerte, dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición.

Xenobiótico: Deriva del griego *xeno* ('extraño') y *bio* ('vida'). Se aplica a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados artificialmente por el ser humano.

RESUMEN

El potencial impacto que representa la contaminación por metales en el ambiente acuático como resultado de la actividad industrial, urbana y en el tratamiento de aguas residuales, precisa de estudios ecotoxicológicos constantes. Precisamente el sulfato ferroso se utiliza en la purificación de agua por floculación y en la eliminación de fosfatos de las plantas de tratamiento de aguas municipales e industriales; otros usos se dan en la fabricación de tintas, como acondicionador del césped y para eliminar los musgos, terminando siendo todos ellos vertidos en aguas costeras.

La presente tesis establece a través de un bioensayo de toxicidad aguda la evaluación del efecto toxicológico del FeSO_4 a 24h de exposición y la influencia de la variación del pH sobre nauplios de *Artemia franciscana*, un anostraca planctónico de ecosistemas salinos.

Los resultados obtenidos para los valores de pH 4.5, 5.5 y 6.5 fueron para una $\text{CL}_{50(24)}$ de 43.25 mg/L, 41.30 mg/L y 42.66 mg/L respectivamente, mientras que para el pH control (8.5) la $\text{CL}_{50(24)}$ fue de 172.98 mg/L. Según estos resultados, a valores de pH bajos, el FeSO_4 es más tóxico a corto plazo para los nauplios de *Artemia franciscana*.

Palabras clave: *Artemia franciscana*, sulfato ferroso, CL_{50} , pH, aguas residuales

ABSTRACT

The potential impact of metal contamination on the aquatic environment as a result of industrial activity, urban and wastewater treatment, requires constant ecotoxicological studies. Precisely the ferrous sulfate is used in the purification of water by flocculation and in the elimination of phosphates from municipal and industrial water treatment plants; other uses are given in the manufacture of inks, such as lawn conditioner and to remove mosses, all of which are discharged into coastal waters.

The present thesis establishes through an acute toxicity bioassay the evaluation of the toxicological effect of FeSO_4 at 24h exposure and the influence of the pH variation on nauplii of *Artemia franciscana*, a planktonic anostraca of saline ecosystems.

The results obtained for the pH 4.5, 5.5 and 6.5 values were for a $\text{LC}_{50(24)}$ of 43.25 mg / L, 41.30 mg / L and 42.66 mg / L respectively, whereas for the control pH (8.5) the $\text{LC}_{50(24)}$ was 172.98 mg / L. According to these results, at low pH values, FeSO_4 is more toxic in the short term for *Artemia franciscana* nauplii.

Keywords: *Artemia franciscana*, ferrous sulfate, LC_{50} , pH, sewage water

1. INTRODUCCIÓN

El 63% del agua utilizada en el país para uso consuntivo (uso agrícola, abastecimiento público e industria) proviene de fuentes superficiales (ríos, arroyos y lagos), mientras que el 37% restante proviene de fuentes subterráneas (acuíferos) (CONAGUA, 2008); la ausencia de programas efectivos de vigilancia y control de contaminantes del ambiente costero mexicano, la creciente industrialización y urbanización de la zona costera mexicana y sobre todo la falta de una verdadera aplicación de normas ambientales han ocasionado que el 30% de los ríos y las lagunas del Golfo de México estén contaminados por metales (Mancera y Álvarez, 2006).

Los metales son especies químicas no degradables. Por tal motivo, una vez vertidos al medio, se distribuyen en los entornos aire-agua-suelo, en algunos casos cambiando su estado de oxidación, o incorporarse a los seres vivos. Por lo tanto, su peligrosidad depende de su concentración en el medio y de su combinación con compuestos presentes en los sedimentos costeros y su ingreso a las cadenas alimentarias, donde pueden ocurrir procesos de bioconcentración, bioacumulación y posteriormente biomagnificación (Ponce-Vélez y Vázquez-Botello, 1991).

Para establecer el riesgo asociado a la contaminación en los sistemas acuáticos, es necesario conocer el comportamiento dinámico de estos contaminantes. En el caso de los metales descargados al medio ambiente por vía antropogénica, los efectos ecológicos están relacionados a sus propiedades químicas y también con las características físicas y químicas de los sedimentos. Todos estos factores intervienen en la migración química de los contaminantes en los sistemas hidrológicos. (Leckie, 1995; Benjamín y Leckie, 1995).

Es sabido que la toxicidad de los metales en hábitats acuáticos depende de las características físicoquímicas del agua, tales como la materia orgánica en

suspensión, el pH, la proporción de gases disueltos y la dureza de la misma (Paquin et al., 2002). La naturaleza de ácidos de Lewis de los cationes derivados de los metales pesados conlleva que se vea influenciados por el pH del medio. Así, en función de la acidez o basicidad del medio y de los aniones presentes en la disolución, pueden estar formando multitud de sales neutras, ácidas o básicas. A través de un estudio sobre la solubilidad de níquel (II), zinc (II), cobre (II) y hierro (III) en aguas de origen residual, se observa una importante influencia del pH en relación a la concentración de los iones en solución ya que en rango de 5 y 3.5 existe la mayor retención de Zn (116-85 ppm) mientras que a partir de 3.5 la concentración de los iones Cd es mínima, esto significa que existe un efecto de intercambio iónico (Bouju, 2003). En concreto, existen estudios donde se afirma la existencia de competencia entre los iones metálicos y los protones del agua; debido quizás a que comparten sitio de unión en la membrana externa, denominado “ligando biótico” (Meyer et al., 1999; De Schamphelaere et al., 2005).

Las sales ferrosas, como el sulfato ferroso, se utilizan en el tratamiento de anemias ferropénicas, las sales férricas como astringentes, y ciertos óxidos de hierro como pigmentos en cosmética (Armijo et al., 2015). El sulfato ferroso se usa para purificación de agua por floculación y para eliminar fosfatos en las plantas de depuración, municipales e industriales para prevenir la eutrofización de masas de aguas superficiales (Blanco, 2009). El ion ferroso se encuentra disuelto en aguas naturales subterráneas, de pH ácido y medio reductor (Armijo et al., 2015). Todas estas especies resultan contaminantes en sus diferentes vertidos. La potencial problemática contaminante ha hecho actualmente de la Ecotoxicología un campo multidisciplinario importante, el cual integra a la Toxicología y a la Ecología (Chapman, 2002), la cual difiere de la Toxicología Ambiental en que integra los efectos de los estresores a través de todos los niveles de organización biológica desde el nivel molecular hasta los ecosistemas, mientras que la Toxicología Ambiental se enfoca a los efectos a nivel de individuo o niveles inferiores.

Ante los posibles riesgos contaminantes que derivan de lo anteriormente comentado, el objetivo del presente trabajo, fue evaluar el efecto del sulfato ferroso ante variaciones de pH sobre el primer nivel trófico a través del

zooplancton, utilizando un bioindicador representativo de ecosistemas acuáticos salinos *Artemia franciscana*, microcrustáceo que presenta una alta adaptación fisiológica que le permite la supervivencia en un amplio rango, tanto de salinidad (35-170‰), así como de temperatura (6-40°C). Sin embargo, se trata también de un organismo sensible que en tiempos reducidos permite detectar efectos tóxicos, además su facilidad de cultivo, corto ciclo de vida y su distribución cosmopolita, le ha hecho ganar popularidad como organismo de prueba en estudios de Toxicología y sobre todo ser una buena alternativa al uso de otros bioensayos in vivo (Papadopoulos et al., 2004).

2. MARCO TEÓRICO

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha manifestado que “el goce del grado máximo de salud que se pueda lograr es uno de los derechos fundamentales de todo ser humano sin distinción de raza, religión, ideología política o condición económica y social”. Para la OMS la salud es un “estado de completo bienestar físico, mental y social”, quedando fijado el nivel de salud por el grado de armonía que exista entre el hombre y el medio que sirve de escenario o de recurso de vida. La contaminación del medio acuático (figura 1) es uno de los factores importantes que rompe esa armonía entre el hombre y su medio ambiente. Se puede definir contaminación como la acción y el efecto de introducir materias o formas de energía, o inducir condiciones en el agua que, de modo directo o indirecto, impliquen una alteración perjudicial de su calidad en relación con los usos posteriores o con su función ecológica (Menéndez, 2010).

El crecimiento progresivo de los núcleos humanos, el aumento de la densidad poblacional, las actividades artesanales y ganaderas, el cultivo intensivo de la tierra para satisfacer las exigencias de una población que evoluciona y el desarrollo industrial son las causas principales del aporte de residuos que contaminan las aguas subterráneas, los ríos, los lagos y los mares, destruyendo o modificando la fauna y la flora, rompiendo el equilibrio del ecosistema, así como la armonía entre el hombre y su medio (Menéndez, 2010).

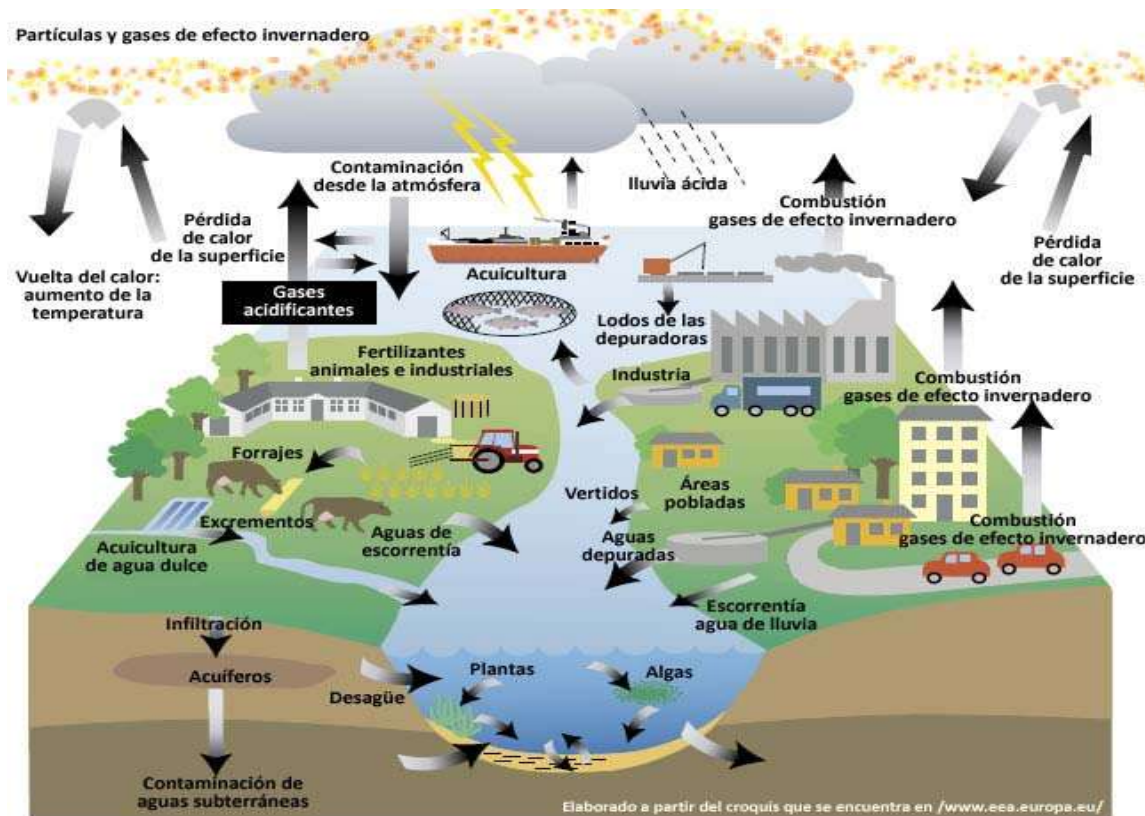


Figura 1. Contaminación del medio acuático (Ærtebjerg et al., 2003).

Los tóxicos que entran a las aguas marinas de fuentes municipales, agrícolas e industriales pueden permanecer suspendidos en la columna de agua, ser incorporados a la biota acuática o depositados sobre el fondo e incorporarse en los sedimentos marinos. Algunos de estos contaminantes químicos son muy persistentes, mientras que otros son más susceptibles a transformaciones físicas, químicas o biológicas (Beg et al., 2001); dando lugar al proceso de biomagnificación (figura 2), que es la secuencia de procesos en un ecosistema por medio de la cual las concentraciones de una sustancia específica aumentan progresivamente a lo largo de la cadena trófica y son más elevadas en los organismos de mayor nivel trófico, es decir, en los niveles superiores de la cadena alimenticia (Martínez y Romieu, 1997).

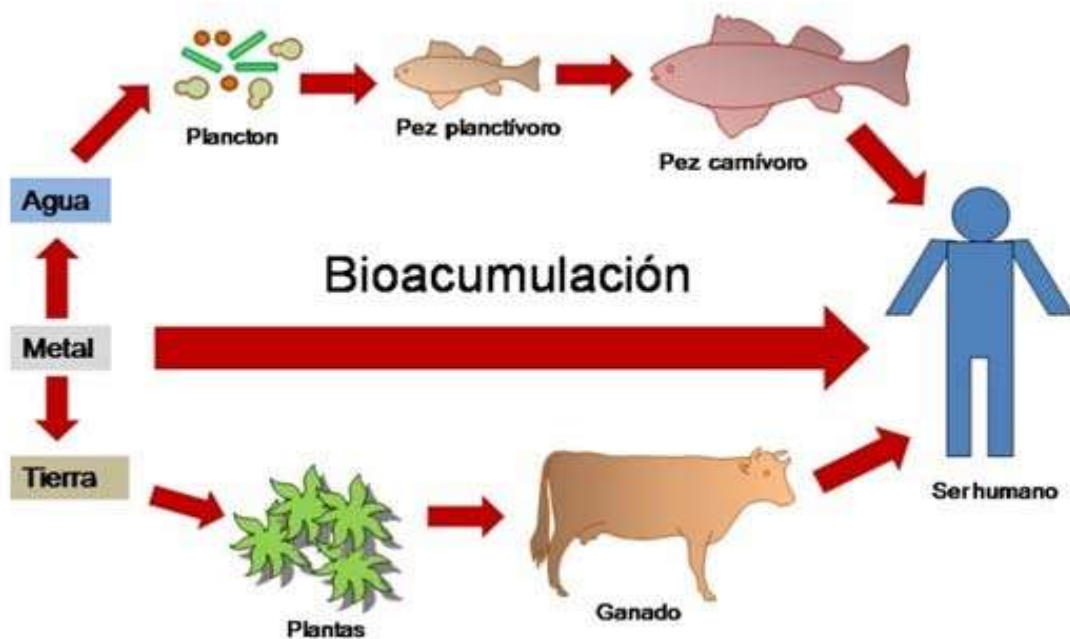


Figura 2. Biomagnificación y Bioacumulación de tóxicos (Fuente: <http://www.ecoticias.com/residuos-reciclaje/115317/bioacumulacion-toxicos>)

La determinación de los efectos tóxicos de los compuestos químicos que ingresan como contaminantes a través de efluentes descargados en los sistemas acuáticos, constituye una de las principales tareas de los investigadores dedicados al análisis de la calidad del agua y actualmente a los que realizan estudios de evaluación de riesgo ambiental. En países desarrollados, esta problemática se ha canalizado efectivamente a través de esquemas normativos que incluyen de manera importante la determinación de los efectos sobre los sistemas biológicos, tanto en exposiciones de corto como de largo plazo (Hobbs et al., 2005), y se ha llegado incluso hasta el nivel de no sólo determinar lo que ocurre con las especies aisladas, representativas de estos ambientes, sino que se han impulsado de manera importante los estudios sobre las rutas y mecanismos de transporte de los contaminantes en los ecosistemas y la determinación de la acumulación,

transformación y efectos diferenciales que ocurren en las comunidades que habitan ahí, lo que ha dado lugar al desarrollo de una nueva disciplina científica conocida como Ecotoxicología (Maki, 1983).

La SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales) ha identificado varias de las actividades que son de su competencia, tales como la revisión de estudios ecotoxicológicos para el registro de nuevos plaguicidas, el análisis de estudios de evaluación de riesgo ecológico, la caracterización de los residuos industriales, la evaluación de la contaminación por emisiones, fugas, derrames y descargas, entre otras requieren de procedimientos estandarizados para medir los impactos que ocasionan sobre los organismos y los ecosistemas. Hoy en día dichas actividades se regulan únicamente con análisis fisicoquímicos, con los cuales no es posible determinar los efectos biológicos. Por tal motivo, es importante complementar dichos análisis con bioensayos de toxicidad para determinar los efectos sobre los individuos, los cuales puedan afectar a las poblaciones y los ecosistemas en general. Con la interacción de la información generada en ambas pruebas (fisicoquímicas y biológicas) se contará con una visión más completa de los efectos adversos que ocasionan los contaminantes sobre los componentes bióticos y abióticos de los ecosistemas, coadyuvando a determinar medidas integrales para proteger el ambiente (Ramírez y Mendoza, 2008).

Otro uso de los ensayos ecotoxicológicos se puede encontrar en el control de las descargas de aguas residuales; en los ochentas, la EPA (Environmental Protection Agency) reportó que al controlar las descargas únicamente a través de requerimientos de tratamiento basados en la tecnología, muchas de las descargas seguían siendo tóxicas y podían causar problemas de calidad del agua. Entonces, el NPDES (National Pollutant Discharge Elimination System) fue implementado y los métodos químicos específicos, así como algunas pruebas biológicas fueron recomendados para la evaluación y reducción de las descargas tóxicas (EPA, 2004).

Tiempo después, los límites para los efluentes debían controlar la toxicidad de estos para garantizar la protección de la vida acuática y se recomendó una serie de bioensayos o pruebas biológicas agudas y crónicas que incluían algas, peces e invertebrados tanto de agua dulce como marina; todas las pruebas pasaron por una evaluación exhaustiva que concluyó con la publicación en 2002 de los protocolos actualmente aceptados (EPA, 2002a; EPA, 2002b; EPA, 2002c), los cuales son utilizados para probar la toxicidad de los efluentes y así calcular la dilución que debe aplicárseles para poder ser descargados en los ecosistemas acuáticos.

2.1 CALIDAD DE LAS AGUAS

La calidad del agua proporciona un indicador de la salud del ecosistema y se puede utilizar para identificar fuentes potenciales de contaminación ambiental (Bilotta et al., 2008). Las aguas de los lagos, mares y ríos libres de contaminación antrópica tienen, de todos modos, impurezas; las que no están incluidas dentro del concepto de contaminación. Estos elementos o partículas se incorporan al agua al atravesar, como precipitación, las nubes y la atmósfera y al discurrir por el suelo o a través de él (Menéndez, 2010).

Ahora bien, el hombre no sólo ha utilizado las aguas para su consumo sino también para su actividad y confort, convirtiendo las aguas usadas en vehículo de desechos. De aquí proviene la denominación de aguas residuales. Pueden distinguirse dos clases de aguas residuales: Aguas blancas o de lluvia y Aguas negras o urbanas.

En cuanto a las zonas costeras con sus complejos y frágiles ecosistemas terrestres y marinos, tienen gran importancia la calidad de sus aguas ya que son lugares para la eclosión y el crecimiento de peces, mamíferos marinos y anfibios, proveen alimento y protección a cientos de especies, ocupan el 18% de la superficie terrestre y proveen más del 90% de la captura mundial de peces. Sin embargo, ellas reciben casi toda la descarga de aguas residuales, incluidas las

negras y químicos procedentes principalmente de la agricultura, lo que conducirá a una eutrofización (Figura 3) unida a la destrucción y alteración del hábitat, cambios en la hidrología y el flujo de sedimentos (Menéndez, 2010).



Figura 3. Eutrofización (Menéndez, 2010).

2.1.1 PARÁMETROS DE CALIDAD

El contenido total de materia sólida contenida en el agua se define como sólidos totales (ST), comprendiendo tanto los orgánicos o volátiles (V) como los inorgánicos o fijos (F). Estos pueden encontrarse como (Menéndez, 2010):

- Sólidos disueltos (SD), que no sedimentan, estando en estado iónico o molecular.
- Sólidos en suspensión (SS), que pueden ser sedimentables (Ss), los que por su peso sedimentan fácilmente en un período de tiempo (2 horas en cono Imhoff), y no sedimentables (Sc), que no sedimentan tan fácilmente

porque su peso específico es próximo al del líquido o por encontrarse en estado coloidal.

2.1.2 Turbidez

Se debe a la cantidad de materias en suspensión que hay en las aguas residuales; limo, materia orgánica y microorganismos. Esta turbidez, en las masas de aguas receptoras, afecta a la penetración de los rayos solares, lo que redundaría en una menor productividad primaria (Espigares-García y Pérez-López, 1985). Existe una interrelación entre la turbidez y los sólidos en suspensión, pero sólo puede establecerse una relación empírica para cada sitio específico, que puede resultar de utilidad dado que la medición de turbidez es más rápida (Menéndez, 2010).

2.1.3 Oxígeno

Siendo el oxígeno la fuente energética de los seres vivos, se convierte en índice fundamental para la definición y control de las aguas residuales. Se utiliza el índice de Concentración de Oxígeno Disuelto (OD). La cantidad de oxígeno en el agua puede ser incrementada por captación a través de la superficie de interfase agua-aire o por acción fotosintética debida, principalmente, a las algas verdes. La cantidad de oxígeno puede disminuir por la respiración de los microorganismos, por la elevación de la temperatura, por reacciones químicas y por el metabolismo de microorganismos regidos por la acción enzimática (Menéndez, 2010).

2.1.4 pH

Parámetros fisicoquímicos como el pH y la temperatura determinan las condiciones de base fundamentales para muchas reacciones químicas y procesos

biológicos. Así el agua está disociada en iones H^+ y OH^- . Las sales minerales disueltas en el agua se disocian en iones positivos y esta ionización varía de unos compuestos a otros. Hay organismos que viven en aguas con un pH ácido; otros viven en medios acuáticos alcalinos. Las aguas dulces tienen el pH entre 6.5 y 8.7; las aguas marinas entre 8 y 8.5 (Menéndez, 2010).

El pH de un agua es, por definición, el logaritmo decimal de la inversa de su concentración en iones H^+ : $pH = \log 1/[H^+]$, ésta es la expresión de su acidez o de su alcalinidad. El conocimiento de este sistema permite comprender mejor la importancia del pH de la reserva alcalina y el efecto tampón del agua de mar ya que si bien la temperatura y salinidad son las características principales de estas aguas, sin embargo, no son suficientes para dominar los estudios sobre la biología de los diversos organismos. Es preciso tener datos sobre los diversos iones contenidos en el agua, pues ciertos de ellos presentan una importancia particular; estos son, por ejemplo, aquellos que dan a la solución de las sales disueltas un carácter ácido o alcalino (Barnabe, 1991).

El pH del agua marina es, salvo casos particulares, superior a 7, ello supone que contiene un excedente alcalino susceptible de compensar rápidamente una disminución de pH, debida, por ejemplo, a un aporte de ácidos o de compuestos ácidos en el medio. Este exceso de base o reserva alcalina está constituido esencialmente por cationes básicos asociados a radicales de ácidos débiles como los ácidos carbónicos o bóricos. Ello confiere al agua de mar la propiedad de las soluciones tampones que, limitando las variaciones de pH, permite el mantenimiento de condiciones del medio favorables a la vida de los organismos marinos (Barnabe, 1991).

En las aguas superficiales a pH 8, las algas llevan a cabo la fotosíntesis del carbono, nitrógeno y azufre. Este proceso proporciona poder reductor a un gradiente vertical característico que va hacia las aguas profundas y oscuras. Mientras que, a pH 7, las bacterias llevan a cabo un proceso inverso, desencadenando a su vez un flujo de electrones hacia la zona iluminada (Barnabe, 1991).

La mayoría de especies toleran valores de pH comprendidos entre 6 y 9, es decir, un rango bastante más amplio que el de las variaciones que normalmente se registran en el medio natural. Por ejemplo, los valores ácido y básico de pH que en cuarenta días causan la mortalidad del 50% de los alevines del salmón del Atlántico serían del orden de 4.5 y 10.2 respectivamente (Barnabe, 1991). Un aspecto importante del pH es la agresividad de las aguas ácidas, que da lugar a la solubilización de sustancias por ataque a los materiales (Espigares-García y Pérez-López, 1985).

De este modo, un efluente con pH adverso puede alterar la composición y modificar la vida biológica de las aguas naturales. También es más difícil de tratar por métodos biológicos, que sólo pueden realizarse entre valores de pH de 6.5 a 8.5. Las aguas residuales urbanas suelen tener un pH cercano a 7 (Espigares-García y Pérez-López, 1985).

Aparte del efecto directo, el pH tiene un efecto indirecto, influenciando la toxicidad de algunas sustancias, especialmente de aquellas en las que, la toxicidad depende del grado de disociación (Espigares-García y Pérez-López, 1985).

2.2 AGUAS RESIDUALES

Las aguas residuales se pueden definir como aquellas que, por uso del hombre, representan un peligro y deben ser desechadas porque contienen gran cantidad de sustancias y/o microorganismos, dentro de este concepto se incluyen aguas con diversos orígenes (Espigares-García y Pérez-López, 1985):

- *Aguas residuales domésticas o aguas negras*: proceden de las heces y orina humanas, del aseo personal y de la cocina y de la limpieza de la casa. Suelen contener gran cantidad de materia orgánica y microorganismos, así como restos de jabones,

detergentes, lejía y grasas. Sus volúmenes son menores, sus caudales más continuos y su contaminación mucho mayor.

- *Aguas blancas*: pueden ser de procedencia atmosférica (lluvia, nieve o hielo) o del riego y limpieza de calles, parques y lugares públicos. En aquellos lugares en que las precipitaciones atmosféricas son muy abundantes, éstas pueden de evacuarse por separado para que no saturen los sistemas de depuración.
- *Aguas residuales industriales*: proceden de los procesamientos realizados en fábricas y establecimientos industriales y contienen aceites, detergentes, antibióticos, ácidos y grasas y otros productos y subproductos de origen mineral, químico, vegetal o animal. Su composición es muy variable, dependiendo de las diferentes actividades industriales.
- *Aguas residuales agrícolas*: procedentes de las labores agrícolas en las zonas rurales. Estas aguas suelen participar, en cuanto a su origen, de las aguas urbanas que se utilizan, en numerosos lugares, para riego agrícola con o sin un tratamiento previo.

En la tabla 1, se observa de manera más detallada el origen y tipo de contaminantes principales de las aguas residuales:

Tabla 1. Contaminantes presentes en aguas residuales y sus consecuencias ecológicas, estéticas y en la salud humana (Sandoval, 2008).

Contaminantes	Parámetro de caracterización	Tipo de efluentes	Consecuencias
Sólidos suspendidos	Sólidos suspendidos totales	- Domésticos - Industriales	- Problema estéticos - Depósitos de barros - Adsorción de contaminantes - Protección de patógenos
Sólidos flotantes	Aceites y grasas	- Domésticos - Industriales	Problemas estéticos
Materia orgánica biodegradable	DBO	- Domésticos - Industriales	- Consumo de Oxígeno - Mortalidad de peces - Condiciones sépticas
Patógenos	Coliformes	Domésticos	Enfermedades transmitidas por el agua
Nutrientes	Nitrógeno Fósforo	- Domésticos - Industriales	- Crecimiento excesivo de algas (eutrofización del cuerpo receptor) - Toxicidad para los peces (amonio) - Enfermedades en niños (nitratos) - Contaminación del agua subterránea.
Compuestos no biodegradables	Pesticidas Detergentes Otros	- Industriales - Agrícolas	- Toxicidad (varios) - Espumas (detergentes) - Reducción de la transferencia de Oxígeno (detergentes) - No biodegradabilidad - Malos olores
Metales pesados	Elementos específicos (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn.)	Industriales	- Toxicidad - Inhibición al tratamiento biológico de las aguas residuales - Problemas con la disposición de los barros en la agricultura - Contaminación del agua subterránea

2.3 ECOSISTEMAS ACUÁTICOS

Los ecosistemas acuáticos son sistemas donde los procesos están relacionados por el flujo de agua y el consiguiente transporte de energía, masa y biomasa. En ellos, el cambio en el sistema físico (abiótico) motoriza la reacción del sistema biótico. La estructura principal de un ecosistema está constituida por la

cadena alimenticia, que en el caso de un ecosistema acuático puede ser esquematizada como sigue (figura 4) (Menéndez, 2010):

- Comienza con la entrada de nutrientes (fósforo, nitrógeno, silicatos, dióxido de carbono) y energía (radiación solar).
- Las microalgas y macro algas producen materia orgánica (biomasa) y oxígeno por medio de la fotosíntesis, mientras consumen nutrientes y utilizan luz solar (productores primarios o primer nivel trófico).
- La biomasa es ingerida por el zooplancton, pequeños crustáceos y pequeños peces (consumidores primarios o segundo nivel trófico).
- Los consumidores primarios son consumidos por especies más grandes de peces que, a su vez, son presa de peces aún mayores, pájaros, mamíferos y el hombre (tercer y mayores niveles tróficos).
- Los excrementos y los cuerpos muertos (detritos) caen al fondo del sistema acuático, donde son ingeridos por las bacterias y digeridos como minerales que sirven nuevamente como nutrientes, cerrando el ciclo.

permite también que sean transportados a distancias considerables, tanto por el aire como por el agua. Uno de los resultados más graves por su persistencia es la amplificación biológica de la concentración de los metales en las cadenas tróficas. Como consecuencia de este proceso, los niveles de metales en los miembros superiores de la cadena alimentaria pueden alcanzar valores mucho más elevados que los que se encuentran en el aire o en el agua contaminada (Orozco et al., 2003). Cada metal y cada elemento químico contaminante tienen un mecanismo de acción y un lugar de acumulación preferido.

Los metales se encuentran presentes formando parte de todos los seres vivos. Los metales son considerados no esenciales cuando no tienen una función biológica conocida, y esenciales, cuando son necesarios para el desarrollo y el crecimiento normal de los organismos (Páez-Osuna, 1996a). Los metales esenciales y no esenciales resultan altamente tóxicos en altas concentraciones en el medio y en los tejidos de los organismos, ya que provocan perturbaciones en una amplia variedad de sistemas enzimáticos en los compartimientos intracelulares (Páez-Osuna, 1996b). En la figura 5 se puede apreciar un resumen.

METALES ESENCIALES Y TÓXICOS

Esenciales (fisiológicos) o No Esenciales	
Esenciales	No Esenciales
zinc	cadmio
Hierro	níquel
magnesio	plomo
cobre	aluminio
cobalto	arsenico

algunos metales son biológicamente importantes

- Funcionan como cofactores
- componentes integrales de **enzimas** (Mg) y moléculas biológicamente activas

Ejemplos: Fe : hemoglobina, citocromos Mg: clorofila

Ejemplos de Metales Tóxicos

(Pb) Síntesis del hemo y Síntesis de Clorofila
 (Hg, Pb) Neurológicos: daño mental, entumecimiento, visión tunel
 (Cd) Nefrotoxicidad, Interrumpe la entrada del Calcio y Osteoporosis

Figura 5. Metales esenciales y tóxicos (García-Casallas, 2011).

El peligro de los elementos metálicos potencialmente tóxicos depende de su concentración en el medio y de su combinación con compuestos orgánicos presentes en los sedimentos costeros y su ingreso a las cadenas alimentarias, donde pueden ocurrir procesos de bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación (Ponce-Vélez y Vázquez-Botello, 1991). Otros factores como el pH, la concentración de microorganismos y la cantidad o tipo de aguas residuales también pueden afectar el grado de la toxicidad de los metales (Albek et al., 1997).

La alta concentración de metales en el ambiente tiene frecuentemente un origen antropogénico (Figura 6). En primera instancia, los metales de la clase B (Cd, Pb, Cr, Ni, Cu, Zn y Fe) son una de las principales fuentes de contaminación por metales en las aguas marinas (Canli et al. 2001). No obstante, los efectos adversos de los metales dependen de su interacción con los organismos o las comunidades en su totalidad. Existe un balance muy delicado entre los organismos y el ambiente, el cual está determinado por la

utilización de los metales en los procesos catalíticos que ocurren en la célula y la bioacumulación de estos niveles tóxicos (Figura 7). Este balance está influenciado no solamente por la abundancia y disponibilidad de los metales en la corteza terrestre, sino también por las transformaciones que sufren estos elementos a consecuencia de las alteraciones fisicoquímicas y biológicas que provocan y/o aceleran las actividades humanas (Páez-Osuna, 2005).

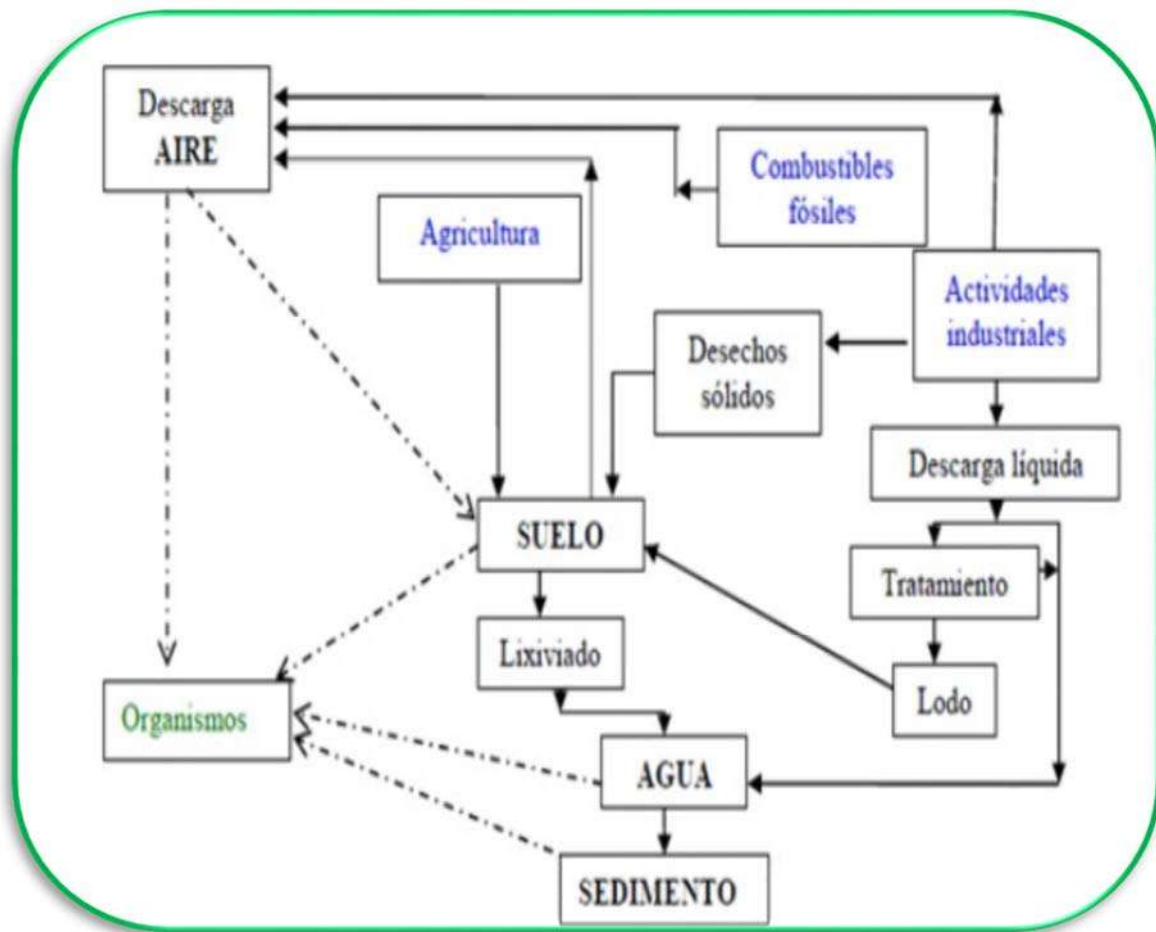


Figura 6. Principales destinos y fuentes de emisión de metales en el ambiente (Marín-Leal, 2013).

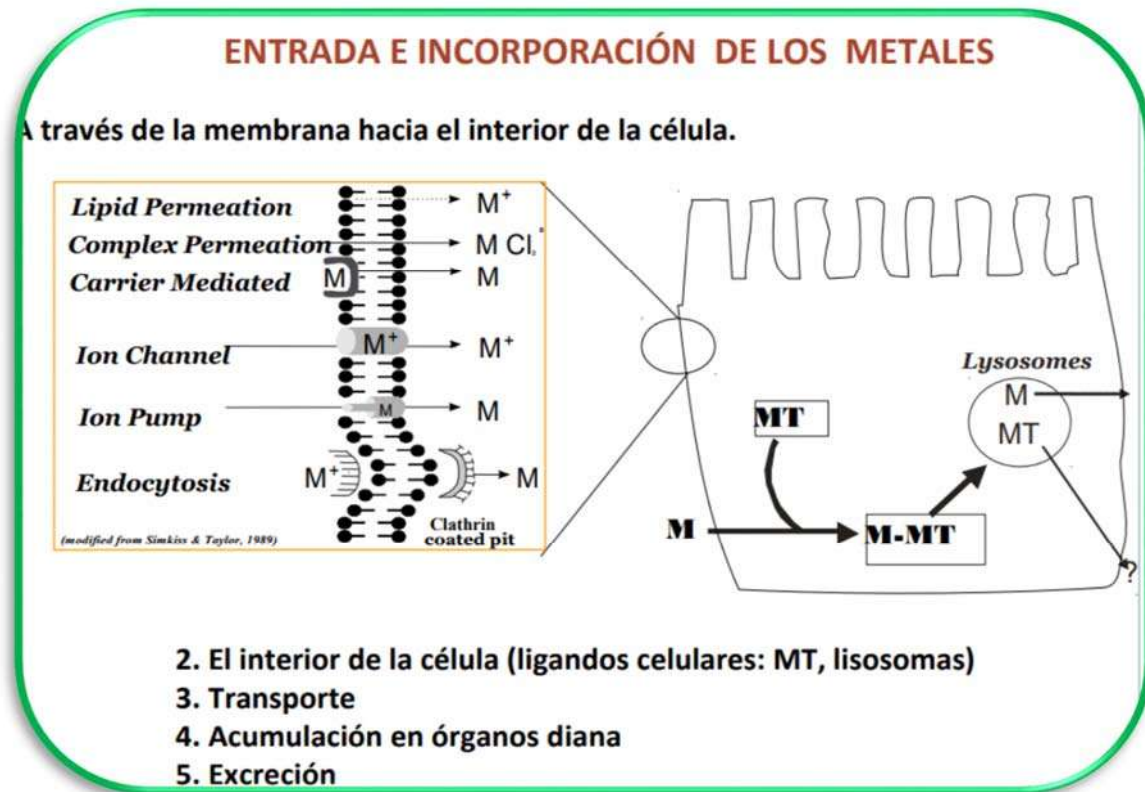


Figura 7. Entrada e incorporación de los metales en la célula (Alvarado, 2013).

Existe una numerosa cantidad de factores que tienen influencia sobre la toxicidad de los metales en los organismos acuáticos. En primera instancia éstos pueden dividirse en factores de tipo fisicoquímico y de tipo biológico. Los primeros involucran a todos aquellos parámetros (pH, potencial redox e iones inorgánicos), que afectan a la especiación química de los metales, con la presencia de otros metales y de otros contaminantes (plaguicidas, hidrocarburos del petróleo). Los factores biológicos que influyen o que tienen relación con los efectos de los metales están estrechamente vinculados con las condiciones propias de los organismos como son la edad, talla, peso, sexo, estadio, madurez gonádica, capacidad de adaptación, hábitos alimenticios, entre otros (Páez-Osuna, 2005). En la tabla 2 se muestra de manera más detallada los diferentes factores que determinan la toxicidad de los metales disueltos.

Tabla 2. Factores que afectan a la toxicidad de los metales pesados disueltos (Bryan, 1976).

Forma del metal	Inorgánica
	Orgánica
	Soluble: Ion, complejo o quelato iónico, molécula
	Particulado: Coloidal, precipitado, adsorbido
Presencia de otros metales o tóxicos	Acción conjunta
	Antagonismo
	Sin interacción
	Aditiva, más o menos que aditiva
Factores que afectan a la fisiología del organismo y probablemente la forma del metal en agua	Temperatura
	pH
	Oxígeno disuelto
	Luz
	Salinidad
Condiciones del organismo	Estadio de desarrollo (Ej: huevo, larva)
	Cambios en el ciclo vital (Ej: reproducción)
	Edad y tamaño
	Sexo
	Estado nutricional
	Actividad
	Estructuras de protección adicional (Ej: concha)
	Adaptación a los metales
Respuesta etológica	Comportamiento alterado

Los efectos que las altas concentraciones de metales producen en el medio acuático son:

- Reducción de la diversidad del sistema.
- Bioacumulación de metales pesados en los tejidos de los organismos marinos a lo largo de la cadena trófica hasta llegar al hombre.
- Mutaciones en las poblaciones que va en detrimento de la viabilidad genética y de la calidad del producto.

En la tabla 3 se muestran algunas de las variables que influyen sobre la forma química de los metales, que a su vez influyen en la toxicidad de los mismos, por ello los factores que afectan a la especiación química, también influyen indirectamente en los efectos fisiológicos y toxicológicos que producen los metales sobre los organismos.

Tabla 3. Factores que afectan la especiación química y que influyen en la toxicidad de los metales en el ambiente acuático (Modificado de Stumm y Morgan, 1984).

Variables	Afectaciones
Alcalinidad, pH, ligandos orgánicos e inorgánicos	Cambios en la distribución de las especies que influyen en la formación de complejos; cambios en la capacidad de adsorción
Densidad de organismos	Reduce la disponibilidad de metales y cambia la distribución de las especies a causa de la adsorción sobre las superficies celulares y/o acomplejamiento de los exudados de la biota
Concentración de partículas y coloides	Los metales son secuestrados por partículas de los óxidos de hierro, manganeso y aluminio; y de las arcillas
Potencial redox	Afecta el estado de oxidación de los metales; la disponibilidad y la movilización de ciertos metales como el manganeso

2.4.1 CONTAMINANTES METÁLICOS MÁS IMPORTANTES

Se puede diferenciar la mayor o menor peligrosidad de los metales en relación con diversos factores: toxicidad, abundancia, fuentes de aportación, forma química en la que se encuentran, etc. De acuerdo con la clasificación en función de su toxicidad (niveles de DL_{50} o EC_{50}) que se utiliza desde el punto de vista legislativo (Orozco et al., 2003). Así, vemos en la tabla 4, una relación de metales ordenados en función de su límite de tolerancia en la legislación europea de aguas potables. Cuanto menor es su valor mayor es la toxicidad del elemento.

Tabla 4. Niveles de tolerancia a metales (Orozco et al., 2003).

Metal	Límite de tolerancia ($\mu\text{g/L}$)
Zinc	5,000
Cobre	2,000
Hierro	200
Manganeso	50
Cromo	50
Níquel	20
Plomo	10
Selenio	10
Antimonio	5
Cadmio	5
Mercurio	1

La legislación española de aguas potables (R.D. 1.138/1990) establece una distinción entre los diversos elementos metálicos según su mayor o menor peligrosidad. Es importante destacar que en la contaminación por metales la mayor o menor toxicidad o peligrosidad no es sólo debida a la naturaleza y

concentración de los mismos, sino que cobra especial importancia un tercer factor; la forma química en que se encuentren (Orozco et al., 2003).

Con el tiempo, la EPA ha desarrollado un paradigma para la evaluación del comportamiento y los efectos de los compuestos orgánicos en el medio ambiente. Los elementos clave de este marco son el principio fundamental de la lipofilia como motor de muchos eventos ambientales y de exposición, la importancia de la ley de Henry para las transferencias intermedias, la degradabilidad y el potencial para la transformación química de un material peligroso y el hecho de que la mayoría de los orgánicos en el medio ambiente normalmente existe en una forma. Con pocas excepciones (principalmente para compuestos inorgánicos fuertemente covalentes u organometálicos), los metales no exhiben estos comportamientos (Langmuir et al., 2005).

En particular, aunque los metales pueden experimentar una variedad de transferencias intermedias y reacciones químicas, son indefinidamente persistentes y conservadores en el medio ambiente. Posiblemente lo más importante; la especiación o forma química de un metal tiene un profundo impacto en su comportamiento y efectos ambientales (Langmuir et al., 2005).

El término “especiación” usado por muchos químicos ambientales está mal definido. Forstner (1995) se refiere a la especiación como aquellos aspectos de la química del metal incluyendo precipitación-disolución, adsorción-desorción, condiciones redox, contenido de agentes quelantes solubles y formación de complejos en relación con el pH; el cual, afecta a la especiación química y a la movilidad de muchos metales (Wood, 1989; Baruah et al., 1996; Bilos et al., 1998); además, juega un papel importante en las interacciones de los metales con parámetros como la dureza del agua y con los compuestos orgánicos (Prosi, 1981; Rovira, 1993).

Bodek et al. (1988) identifican un grupo de propiedades o procesos que son importantes para el comportamiento ambiental de metales, incluyendo volatilización, fotólisis, deposición atmosférica, equilibrio ácido/base, polimerización, formación de complejos, reacción de transferencia de electrones,

solubilidad y equilibrios de precipitación, transformación y difusividad. Para propósitos regulatorios, la definición recomendada de IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) podría ser más útil (Templeton et al., 2000). En esta definición, la “especiación” se refiere a la distribución de un elemento entre las especies químicas definidas, que son las formas específicas de un elemento definido como composición isotópica, estado electrónico o de oxidación y/o estructura compleja o molecular (Langmuir et al., 2005)

2.4.2 LAS DIANAS DE TOXICIDAD DE LOS METALES

Las principales dianas de los metales son proteínas, muchas de ellas con actividad enzimática, afectando a diversos procesos bioquímicos, membranas celulares y orgánulos (figura 8). Los efectos tóxicos de los metales se ejercen, salvo pocas excepciones, por interacción entre el ion metálico libre y la diana. Son tóxicos eminentemente lesionales que afectan gravemente a funciones celulares fundamentales para su supervivencia por mecanismos complejos, no siempre bien conocidos. De acuerdo con Alvarado et al., (2006), entre los efectos que producen se destaca lo siguiente:

- Interacción con metales esenciales por similitud electrónica.
- Formación de complejos metal-proteína con inactivación de su función.
- Inhibición enzimática de proteínas con grupos SH.
- Afectación de orgánulos celulares: mitocondrias, lisosomas, microtúbulos.

Los metales y metaloides pueden generar, carcinogénesis química, alteraciones en la expresión génica y estrés oxidativo. El metal interactúa con H_2O_2 produciendo $OH^\cdot$ mediante la reacción de Fenton. Entre los efectos que provoca el radical $OH^\cdot$ se encuentran: daños en lípidos de membrana, en proteínas, en ácidos nucleicos y en general daños metabólicos en el organismo, que pueden conducir a la muerte celular. Estos efectos pueden ser premutagénicos (Alvarado et al., 2006).

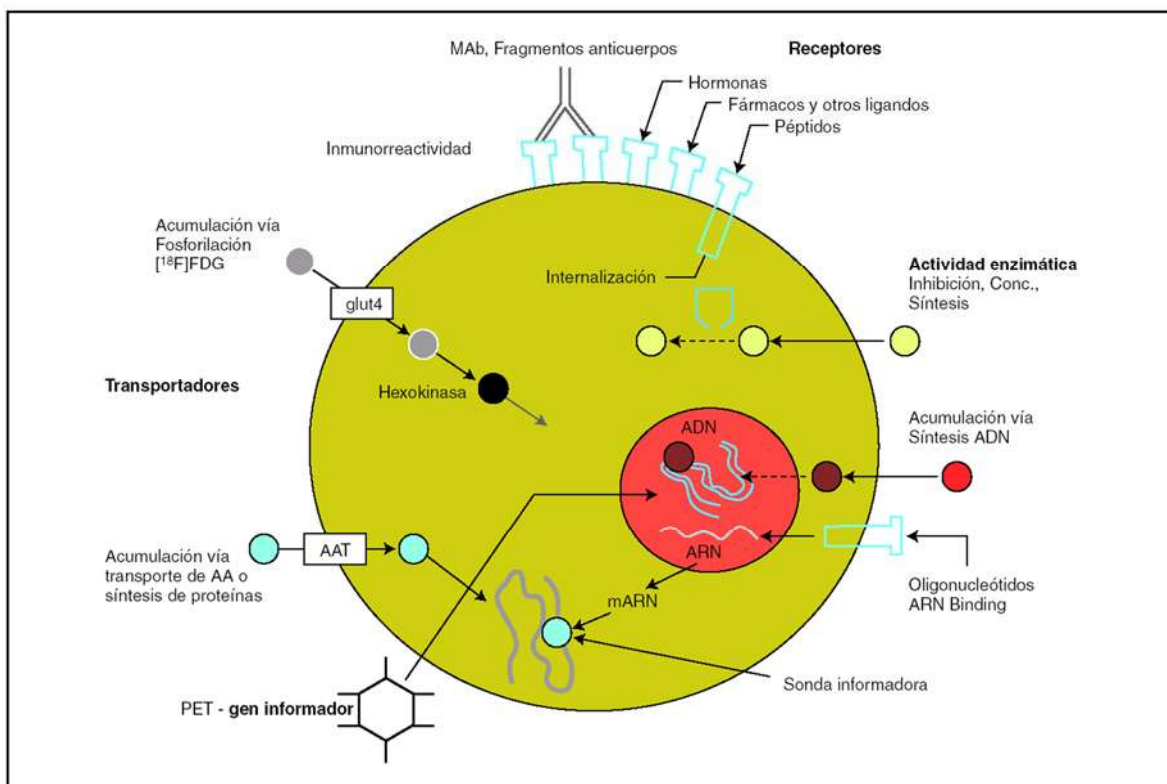


Figura 8. Representación de las diferentes dianas biológicas de los metales (Gambhir, 2006).

Así, los metales interactúan con la cromatina, donde alcanzan el núcleo uniéndose al ADN, a proteínas histónicas o a proteínas no histónicas, generando alteraciones en el ADN, y como se ha mencionado anteriormente, los metales producen estrés oxidativo a través de la interacción con H_2O_2 resultando el radical $OH^\cdot$ dando lugar a (Alvarado et al., 2006):

- Oxidación de bases o de la desoxirribosa
- Pérdida de bases
- Formación de hélices sencillas
- Roturas de hélices dobles
- Formación de “puentes” ADN-proteína
- Formación de “puentes” ADN-ADN

Los metales afectan a la fidelidad de la replicación por:

- Inhibición de enzimas requeridas para la replicación
- Inhibición de la síntesis de nucleótidos
- Alteración de los procesos de metilación del ADN
- Alteración de los componentes del complejo de replicación del ADN

Los cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN pueden modificar la expresión génica.

2.5 IDENTIDAD E IMPACTO DEL HIERRO EN EL MEDIO ACUÁTICO Y SU MECANISMO DE ACCIÓN

El hierro es un elemento químico de número atómico 26 situado en el grupo 8, periodo 4 de la tabla periódica de los elementos. Su símbolo es Fe y tiene una masa atómica de 55.845g/mol. El hierro es un metal que tiene un color negro lustroso o gris azulado, dúctil, maleable, tenaz, es extremadamente duro y pesado, además se oxida al contacto con el aire y tiene propiedades ferromagnéticas. El núcleo de la Tierra está formado principalmente por hierro y níquel, generando al moverse un campo magnético. Por otro lado, es importante indicar que el hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, representando un 5%, entre los metales sólo el aluminio es más abundante. Se encuentra en hematites, magnetita y limonita, entre en la composición de sustancias importantes en los seres vivos, como las hemoglobinas (Valencia, 2011).

La coexistencia del hierro con el hombre desde el comienzo de la historia de la humanidad ha llevado a este a darle distintos usos, ya que formó parte de las recetas médicas más antiguas, como en el papiro de Eber en Egipto, 1500 años a.C., donde el óxido férrico era utilizado como ungüento para el tratamiento de la calvicie, o en Grecia, 1200 años a.C., donde era mezclado con vino como

tratamiento de la impotencia masculina (Castro del Pozo, 1995; Goodman y Gilman, 1996).

Recién en el siglo XVI se relacionó la deficiencia de hierro con una enfermedad llamada “enfermedad verde” o clorosis (nombre que se le asignaba a la anemia ferropénica en esa época debido al color verdoso-amarillento que adquiría la piel de quienes la padecían). La primera persona en utilizar el hierro como medicamento específico en el tratamiento de la clorosis fue Sydenham, quien a su vez eliminó las sangrías y purgas que se utilizaban comúnmente en esa época (Castro del Pozo, 1995; Goodman y Gilman, 1996).

En 1713, Lemery y Geoffry demostraron por primera vez que el hierro se encontraba presente en las cenizas de la sangre, relacionando directamente a este tejido con dicho metal, estableciendo de esta manera las bases científicas en la terapéutica de su deficiencia. En 1832 el médico francés Pierre Blaud inició el tratamiento de la clorosis mediante la administración de hierro por vía oral, utilizando una píldora compuesta por sulfato ferroso y carbonato de potasio, la cual fue denominada “píldora de Blaud”. En 1932, Castle y colaboradores demostraron la eficacia del hierro inorgánico en la regeneración de la hemoglobina, cuando el mismo era administrado por vía parenteral a pacientes con anemia hipocrómica (Castro del Pozo, 1995; Goodman y Gilman, 1996).

Laurell en 1947, denominó transferrina a la proteína plasmática de transporte de hierro, nomenclatura utilizada en la actualidad, y en 1950, Huff y colaboradores, mediante estudios determinan la distribución, el metabolismo y el balance del hierro en el organismo humano, conceptos que siguen vigentes en la actualidad (Castro del Pozo, 1995; Goodman y Gilman, 1996).

Se lo encuentra en concentraciones que oscilan entre 0.5 a 50mg/l en las aguas corrientes naturales. Se encuentra en la naturaleza formando parte de numerosos minerales, entre ellos muchos óxidos, y raramente se encuentra libre. Para obtener hierro en estado elemental, los óxidos se reducen con carbono y luego es sometido a un proceso de refinado para eliminar las impurezas presentes (Valencia, 2011).

El hierro es un elemento importante que desempeña un papel esencial en muchos procesos de la vida, el requerimiento de este depende de distintos factores biológicos como la biodisponibilidad. El hierro como metal esencial a concentraciones traza es utilizado en reacciones redox en organismos fotosintéticos (Spiro et al., 2004; Mladenka et al., 2005; CONAGUA, 2007). Es un constituyente de citocromo y catalasa, así como componente esencial de la mioglobina que almacena oxígeno en las células de los músculos, también es indispensable para la hemoglobina (CMA, 2010). El hierro con frecuencia se encuentra en aguas y si son anaerobias puede haber concentraciones de varios miligramos por litro sin que el agua, esté coloreada o turbia. Sin embargo, al entrar en contacto con el oxígeno de la atmósfera el hierro ferroso se oxida a ion férrico (CONAGUA, 2007).

2.5.1 LA TOXICIDAD DEL HIERRO

La mayoría de las características que poseen las aguas naturales, son modificadas por factores antropogénicos. Si las condiciones ambientales cambian a un nivel menos favorable, entonces el organismo, haciendo uso de procesos fisiológicos que le permiten compensar parcialmente el efecto, reacciona en sentido de contrarrestar la acción modificadora; eventualmente se alcanza un límite por encima del cual el organismo muere a causa de una condición ambiental drástica, como puede ser una temperatura alta, pH extremo o baja concentración del oxígeno disuelto. Si un organismo dado se encuentra ya bajo una condición de estrés o carga metabólica, dada por una condición ambiental, entonces el organismo se enfrentará a esta condición más la producida por la acción del contaminante tóxico y por consiguiente el organismo será menos capaz de soportar la acción del contaminante y mostrará un incremento considerable en su susceptibilidad. Entonces los factores medioambientales tendrán un comportamiento como si fuesen factores modificantes de la toxicidad del contaminante (Tortorelli y Hernández, 1995).

El hierro metálico y sus aleaciones son de interés porque el agua los corroe en presencia de oxígeno. El resultado de los productos de la corrosión es hierro en estado ferroso el cual puede ser considerado como contaminante del agua. En adición a los productos de corrosión, las aguas naturales pueden ser contaminadas por los vertimientos industriales como las operaciones de niquelado y del lavado de las sales solubles del suelo y las rocas como son los drenajes de las aguas ácidas de mina. Una fuente principal de contaminación por sales de hierro es el proceso de decapado del acero empleado por la industria del acero para remover los óxidos formados durante el proceso de fundición (Valencia, 2011).

Aunque muchas de las sales ferrosas y férricas tales como los cloruros son altamente solubles en el agua, los iones ferrosos son rápidamente oxidados en presencia de oxígeno a la forma férrica y dan lugar a un hidróxido insoluble. Este precipitado tiende a aglutinarse. En aguas subterráneas, el pH y el potencial redox puede ser tal que permiten altas concentraciones de hierro en solución, de este modo en aguas que contienen cantidades apreciables de hierro, exentas de oxígeno disuelto y con alto contenido de anhídrido carbónico, el hierro se encuentra presente bajo la forma divalente (Valencia, 2011).

Cuando el hierro se presenta con una concentración demasiado alta en el agua, puede causar daño a los peces e incluso la muerte. El hierro se puede presentar en diferentes estados, Fe^{2+} (hierro ferroso) y Fe^{3+} (hierro férrico). Cuando el Fe^{2+} , entra en contacto con el aire, se oxida a Fe^{3+} . En peces, esta reacción puede generar obstrucción branquial por acumulación de hidróxido de hierro, causando efectos subletales o mortalidad. El tiempo que demore en presentarse esta adherencia de hierro, va a depender del pH del agua, su salinidad y su temperatura (Henretig, 1998).

En pisciculturas con altas concentraciones de Fe^{2+} , especialmente en aquellas en que el agua utilizada proviene de pozos (bajo oxígeno), cuando el agua entra

en contacto con el aire, se activa el proceso de oxidación y por ende la precipitación de óxido de hierro, proceso que comúnmente ocurre directamente en los estanques con peces. Un bajo pH y bajas temperaturas harán que se produzca una mayor concentración de hierro como Fe^{2+} (hierro ferroso). La toxicidad del hierro va a depender del contacto con elementos orgánicos, ya que diferentes investigaciones han demostrado que la toxicidad se reduce con relación al aumento de materia orgánica (TOC) en el agua. Investigaciones en smolt de salmón muestran que los estudios de hierro deben considerar el estado de oxidación y pH para establecer el potencial efecto tóxico de este metal (Henretig, 1998).

El consumo de hierro en animales acuáticos ocurre mediante las siguientes dos fuentes: el alimento y el agua. Los efectos presentados por el hierro en organismos acuáticos son principalmente indirectos siendo potencialmente tóxicos cuando este elemento es expuesto a concentraciones elevadas (Phippen et al., 2008). Las afecciones dadas por el Hidróxido de hierro y precipitados de humus de hierro provocan alteraciones en el metabolismo normal y en osmorregulación (Vuori, 1995).

En un estudio realizado en salmón se observó la precipitación de hierro en branquias reportando efectos negativos con disminución de consumo de oxígeno en peces que conlleva a un deterioro en la regulación de iones obteniendo bajas concentraciones de estos en plasma, los niveles de glucosa en peces también disminuyen llevando al estrés a estos organismos, y además hacen referencia a una alteración intestinal es debido por una fusión de las laminillas e hipertrofia en células epiteliales (Peuranen et al., 1994).

Los compuestos formados a partir del hierro pueden ser altamente tóxicos en seres humanos (Ramos y Camacho, 2004). En el ser humano la dosis de hierro como elemento origina en el hombre (Henretig, 1998):

- a) >20 mg/kg: manifestaciones GI
- b) >40 mg/kg: toxicidad sistémica

c) >60 mg/kg: dosis mortal

La toxicidad del hierro es debida de un lado a un efecto cáustico directo sobre la mucosa gastrointestinal y, por otro lado, a un efecto tóxico de las moléculas de hierro libre sobre el tracto gastrointestinal, sobre el sistema cardiovascular, sobre el hígado y sobre el Sistema Nervioso Central (SNC). Dentro de las células el hierro bloquea los mecanismos de oxidación que tienen lugar en las mitocondrias, dejando a las células sin su sustento de energía (Henretig, 1998).

La toxicidad sobre el tracto gastrointestinal está relacionada con el efecto corrosivo directo. Si la cantidad de tóxico es suficiente, puede aparecer hemorragia e incluso perforación con peritonitis, pero si el enfermo sobrevive, las placas de necrosis pueden retraerse, dando lugar a obstrucción intestinal (Henretig, 1998).

En el sistema cardiovascular se afecta, en primer lugar, por hipovolemia, si aparece hemorragia gastrointestinal. Además, el hierro provoca una gran liberación de sustancias vasoactivas, tipo serotonina e histamina, que provocan vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, con el consiguiente paso masivo de líquido desde el espacio vascular hacia el extravascular, lo que lleva a más hipovolemia. La respuesta a esto consiste en taquicardia y vasoconstricción. Pero esta respuesta no será suficiente si la intoxicación ha sido importante, en cuyo caso, puede incluso aparecer cierto efecto de depresión de la contractilidad miocárdica por el hierro. También puede aparecer lesión renal por depósito de hierro en las células de los túbulos renales (Henretig, 1998).

Se producen dos grandes trastornos metabólicos: el primero es la acidosis. Esta acidosis se debe a la liberación de hidrogeniones, que se produce al catalizar la reacción de hierro ferroso a férrico y también se debe a la preponderancia del metabolismo anaerobio, ya que las mitocondrias están bloqueadas por el hierro. El segundo trastorno metabólico es la hiperglucemia que el hierro provoca en las primeras fases de la intoxicación, debido a que dificulta la entrada de la glucosa en las células (Henretig, 1998).

El hígado puede afectarse en caso de intoxicación grave. La lesión puede oscilar entre una ligera inflamación y una necrosis masiva. En casos de lesión importante aparecerá la conocida clínica de fallo hepático, con sus manifestaciones neurológicas, de hipoglucemia y hemorragias. Estas manifestaciones aparecen tras un intervalo libre de más de 24h (Henretig, 1998).

Sobre el SNC el efecto de la toxicidad por hierro es escaso y el estado de bajo nivel de conciencia se debe a la hipotensión, a la acidosis o al fallo hepático. De la misma forma, el shock y la acidosis pueden llevar a afectación de cualquier órgano, pero especialmente del riñón, pulmón o páncreas (Henretig, 1998).

2.5.2 SULFATO FERROSO (FeSO_4)

El sulfato ferroso se usa para purificación de agua por floculación y para eliminar fosfatos en las plantas de depuración, municipales e industriales para prevenir la eutrofización de masas de agua superficiales. Grandes cantidades de esta sal (figura 9) se usan como agente reductor, sobre todo para la reducción de cromatos en cemento. El sulfato ferroso se usa en la fabricación de tintas, muy especialmente tinta ferrogálica de hierro, que se usó desde la Edad Media hasta la Revolución Americana. También se usa en la coloración de la lana como mordiente. Puede usarse también para teñir el hormigón de un color amarillento oxidado. Los carpinteros usan disoluciones de sulfato ferroso para teñir la madera de arce con un matiz plateado. En horticultura se emplea como acondicionador del césped y para eliminar los musgos. En la segunda mitad del siglo XIX, el sulfato ferroso se empleó como revelador fotográfico de imágenes por el proceso al colodión húmedo. A veces se añade sulfato ferroso al agua de enfriamiento que circula a través de los tubos de latón de un condensador de turbina para que resistan la erosión y proteger el recubrimiento del interior de estos tubos (Blanco, 2009).

Tradicionalmente se han aplicado diversas tecnologías basadas en tratamientos fisicoquímicos para la eliminación del color de los efluentes textiles, el Proceso Fenton es una de ellas: en el cual se oxida el colorante con una combinación de peróxido de hidrógeno y sulfato ferroso (reactivo Fenton), en condiciones ácidas. El agente responsable de la oxidación es el radical hidroxilo, el cual es muy reactivo; se forma por la descomposición catalítica del peróxido de hidrógeno en un medio ácido. Los radicales hidroxilos oxidan el tinte, y el compuesto formado, precipita con el ion férrico y compuestos orgánicos. Las ventajas de esta alternativa son varias: se consiguen altas velocidades de decoloración si las concentraciones de los reactivos implicados son elevadas, no se forman compuestos clorados como en otras técnicas oxidantes y no existen limitaciones de transferencia de masa por tratarse de un sistema homogéneo. Sin embargo, sus principales desventajas son los costes asociados al tratamiento de lodos (se genera una gran cantidad de lodos poco densos y, por consiguiente, difíciles de decantar) y a los costes de los reactivos (se requiere la adición continua y estequiométrica de Fe(II) y H_2O_2 (Aguayo et al., 2004).

Los efluentes acuosos provenientes de una gran variedad de estas industrias químicas contienen compuestos que son tóxicos y peligrosos tanto para su descarga al medio ambiente como para su almacenamiento. En muchos casos estos efluentes son refractarios al tratamiento biológico convencional, por lo que la biodegradación del efluente como tratamiento exclusivo no constituye una alternativa eficaz (Blanco, 2009).



Figura 9. Sulfato ferroso (Gutiérrez et al., 1992).

2.5.2.1 EFECTOS EN LA SALUD POR CONTAMINACIÓN CON SULFATO FERROSO

Principalmente, como veíamos en la toxicidad por hierro, son los problemas gastrointestinales. Estos son en su mayoría dosis dependientes e incluyen náuseas, vómitos, diarrea o estreñimiento, anorexia y acidez estomacal. Otros efectos secundarios son las manchas en los dientes y la sobrecarga de hierro, y raramente la hemocromatosis secundaria. La condición puede ser tóxica para el hígado. El efecto secundario local del sulfato ferroso es la gangrena.

2.6 INFLUENCIA DEL pH EN EL MEDIO ACUÁTICO

Hay organismos que viven en aguas con un pH ácido; otros viven en medios acuáticos alcalinos. Así, la planta *Elodea canadensis* vive en aguas con un pH entre 7.4 y 8.8. *Typha angustifolia* (enea) vive en aguas con un pH de 8.4

a 9. Los hongos, y otros organismos, viven en medios ácidos. Las aguas dulces tienen el pH entre 6.5 y 8.7; las aguas marinas entre 8 y 8.5. El pH es un parámetro importante en los ecosistemas acuáticos, causa muchos fenómenos químicos y biológicos, especialmente sobre el metabolismo y procesos fisiológicos de peces, camarones y todos los organismos acuáticos. Se ha reportado que los puntos letales de acidez y alcalinidad son de pH 4 y pH 11, respectivamente. Aguas con valores de pH de 6.5 a 9 son las más adecuadas para la producción de organismos acuáticos cultivables, en valores inferiores a 6.5 disminuyen los procesos reproductivos (Talavera et al., 1998).

El pH ejerce una fuerte influencia sobre la toxicidad de ciertos parámetros químicos tales como el amonio no ionizado, que se torna más abundante en pH alcalino y del ácido sulfhídrico (H_2S), el cual aumenta porcentualmente en pH ácido (Talavera et al., 1998). Los efectos directos de pH sobre los organismos son graduales; el mayor efecto de este como factor modificante se da para sustancias que ionizan bajo la influencia del pH, como la mayoría de las moléculas no disociadas, las cuales, pueden ser más tóxicas toda vez que ellas puedan penetrar las membranas celulares fácilmente, esta situación es opuesta para el caso de los metales en los cuales la forma disociada es más tóxica que la no disociada (Tortorelli y Hernández, 1995).

2.6.1 DUREZA DEL AGUA

La dureza del agua ejerce cierta influencia sobre el crecimiento y mineralización del exoesqueleto de organismos de agua dulce tales como juveniles de *Macrobrachium rosenbergii*. Cuando los niveles de dureza son bajos se observa una reducción en la tasa de muda y a la vez una falta de deposición de calcio en el exoesqueleto, prolongándose el periodo de intermuda. En cambio, la dureza del agua de mar para los camarones marinos o de aguas salobres es un fenómeno irrelevante debido a que la dureza del agua

de mar es sumamente alta, presentando una media de 6,600 mg/L de CaCO_3 (Talavera et al., 1998).

2.6.2 SOLUBILIDAD DE NUTRIENTES EN FUNCIÓN DEL pH

La solubilidad de muchos micronutrientes importantes para la producción primaria (fitoplancton) dependen del grado de acidez o alcalinidad del agua. Así, el pH alto influye en la disponibilidad de fósforo ya que, en medio alcalino, este nutriente es absorbido por el calcio presente en el cuerpo de agua, mientras que al bajar el pH (medio ácido), el fósforo se junta con el fierro y aluminio. Por otro lado, en un pH de 6.5 el fósforo se encuentra en solución, libre y disponible para ser fijado por las microalgas y otras plantas acuáticas. A este pH, también son solubles otros minerales como el hierro, cobre, manganeso y zinc (Talavera et al., 1998).

2.6.3 RELACIÓN DEL pH CON LOS ORGANISMOS ACUÁTICOS

El pH es una variable ambiental importante, con influencia en la toxicidad y disponibilidad de los contaminantes (Chapman, 2003; Santos-Guimaraes et al, 2004). El pH posee una estrecha interdependencia entre las comunidades fotosintéticas, animales y el medio acuático. Este fenómeno ocurre a medida en que las comunidades acuáticas interfieren en el pH, así como también el pH influye en el metabolismo de estas comunidades. Con respecto a las comunidades, actúa directamente en los procesos de permeabilidad de la membrana celular de los organismos integrantes, interfiriendo en el transporte iónico intra y extracelular, así como también entre organismos en el medio. Un ejemplo de la interferencia de las comunidades acuáticas en los valores de pH del medio se observa a través de la asimilación del CO_2 , ya que, durante el proceso fotosintético, las macrófitas acuáticas y las microalgas pueden elevar el pH del medio. Este factor es particularmente frecuente en aguas con poco

poder de neutralizar ácidos (baja alcalinidad o capacidad buffer) (Talavera et al., 1998).

En ambientes acuáticos con alcalinidad alta se presenta poca variación, así mismo con alta tasa fotosintética (poder tampón). En estos sistemas de alta alcalinidad el consumo de CO_2 es compensado inmediatamente por la disociación de bicarbonato de calcio. De esta forma las variaciones de pH son pocas, excepto en casos que ocurren floraciones de microalgas o crecimiento de comunidades densas de macrófitas acuáticas. En este último caso, el pH del medio puede llegar a 11. Los organismos heterótrofos interfieren sobre el pH del medio en general, bajándolo. Esta situación ocurre debido a los intensos procesos de descomposición y respiración, a través de los cuales hay liberación de CO_2 , que por hidrólisis origina ácido carbónico e iones de hidrógeno (Talavera et al., 1998).

Además, varios procesos metabólicos que ocurren en las aguas naturales pueden generar iones de hidrogeno, contribuyendo de esta forma con la disminución del pH del medio. Los procesos que destacan son los de oxidación biológica, de intercambio catiónico e hidrólisis de cationes. El tejido branquial en peces también puede ser afectado por la acidez del medio. La cantidad de mucosa branquial se incrementa en los peces cuando estos son expuestos a tenores bajos de pH. Un exceso de mucosa interfiere en el intercambio gaseoso e iónico, que se realiza a través de las branquias. De esta forma, un desequilibrio de balance ácido-básico sanguíneo resulta en estrés respiratorio y disminución de la concentración de cloruro de sodio sanguíneo, factor que provoca un serio disturbio osmótico. Por otro lado, en condiciones de pH bajo, la concentración de iones de aluminio en el agua se incrementa, provocando muchas veces efectos tóxicos en los organismos de cultivo (Talavera et al., 1998).

Según Zirino (1986), el pH se correlaciona con la temperatura, se puede explicar de la siguiente manera: en ausencia de procesos biológicos, el valor

del pH del océano llega a ser de 8.10 (en la escala de protones totales), independientemente de la temperatura. Este es el pH obtenido cuando el dióxido de carbono, en forma de gas como ácido carbónico, y los iones carbonato o bicarbonato alcanzan el equilibrio con el CO₂ atmosférico. El pH permanece relativamente constante con respecto a la latitud porque a mayor temperatura se incrementa la disociación del bicarbonato, pero igualmente disminuye la solubilidad. El pH permanece relativamente constante con respecto a la latitud porque a mayor temperatura se incrementa la disociación del bicarbonato. El pH sigue a la salinidad, en áreas, de aguas de mar frías todo el año, y la fuerte mezcla transporta nutrientes y carbón inorgánico a la superficie. La productividad primaria es menos limitada por disponibilidad de nutrientes, que por la fuerte variación estacional de incidencia de luz. En ambos casos, ya sea la Antártica o las aguas de la costa occidental de Baja California, la respiración produce CO₂ y baja el pH en las aguas sub-superficiales de la zona fótica. Por tanto, el pH y la temperatura, de manera normal, varían directamente mientras que en aguas polares el pH y la salinidad varían inversamente. En todos los casos, pH, temperatura y salinidad parecen estar relacionados, aun cuando las variables representan procesos totalmente distintos. Además, cuando la salinidad aumenta en la superficie y el pH disminuye, los procesos físicos predominan sobre los biológicos. Así pues, el parámetro de pH puede ser una importante herramienta en las evaluaciones de los flujos de CO₂ y en estudios oceanográficos interdisciplinarios.

En referencia al hierro, dependiendo del valor de pH y de la concentración de oxígeno, puede estar presente bajo la forma férrica y ferrosa. A pH neutro y en presencia de oxígeno, el hierro ferroso soluble (Fe²⁺) es oxidado a hierro férrico (Fe³⁺), el mismo que rápidamente es hidrolizado bajo la forma de un precipitado insoluble como hidróxido férrico Fe(OH)₃. En las condiciones habituales de pH (4.5 y 9), el hierro soluble está presente generalmente en estado ferroso. Si el medio es reductor como en la mayoría de las aguas subterráneas, el hierro ferroso puede llegar a alcanzar cantidades elevadas. Por otro lado, el hierro

férrico, no es soluble de un modo significativo, aunque para valores de pH inferiores a 4 puede llegar a serlo (Valencia, 2011). A valores de pH por debajo de 6, la tasa de oxidación del hierro ferroso hacia hierro férrico es extremadamente lenta (Valencia, 2011).

Por otra parte, condiciones anaeróbicas son necesarias para que exista una apreciable concentración de hierro soluble. Por lo demás, a valores de pH por encima de 12, el hidróxido férrico se solubiliza como consecuencia de la formación del anión $\text{Fe}(\text{OH})_3$. El hierro ferroso y el férrico pueden también solubilizarse en presencia de cianuro dando lugar a los complejos ferro o ferrocianuros. Estos compuestos presentan considerables dificultades para ser removidos (Valencia, 2011).

El hierro se oxida bajo la acción del aire o por la adición de cloro, pasando al estado férrico pudiendo así hidrolizarse para dar un hidróxido de hierro insoluble. El hierro puede estar en estado coloidal más o menos combinado con la materia orgánica. Cuando desciende el oxígeno del agua hay un incremento del hierro divalente, esta dinámica es típica de lagos y embalses que experimentan períodos de estratificación térmica, poco oxígeno y alto potencial reductor (Valencia, 2011).

2.7 ECOTOXICOLOGÍA Y LOS ENSAYOS BIOLÓGICOS

La Ecotoxicología es definida como “La ciencia que estudia la polución, su origen, evolución e interacciones con las moléculas que integran dinámicamente los ecosistemas, sus acciones y efectos sobre los seres vivos que forman estos ecosistemas, con su evaluación, como determinantes de criteriología y profilaxis biológica o socioeconómica” (Sanz-Sánchez, 1974).

La Ecotoxicología aplicada tiene como objetivo el desarrollo de protocolos de ensayo para ser utilizados como herramientas de predicción tempranas que permitan definir umbrales permisibles, con niveles de incertidumbre aceptables, y

sirvan de guía a las entidades reguladoras para la toma de decisiones (Day et al., 1988).

Existen diversos organismos de protección ambiental en países centrales (Environment Canadá, Environmental Protection Agency, etc.) y de estandarización (ASTM, OECD, AOAC, ISO, entre otros) que han concretado la elaboración e implementación de sistemas de diagnóstico, base para la generación de estrategias ecosistémicas de protección. Ello, orientado a la obtención de respuestas estandarizadas de laboratorio (bioensayos) que permiten asegurar, dentro de un cierto grado de confiabilidad, la medida obtenida. La estimación del riesgo ecológico se basa en modelos y procedimientos recientemente incorporados (Bartell et al., 1992; Faustman y Omenn, 1996) por algunos organismos de gestión de control ambiental.

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (Castillo, 2004).

Los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades. Por tanto, la toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo o la biocenosis, y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de vida del organismo; las pruebas podrán ser de tipo agudo o crónico (Ingersoll, 1995; Chapman, 2007).

De manera general, los ensayos, también llamados pruebas de toxicidad, pueden ser definidos de acuerdo con Ingersoll, (1995) y posteriormente por Chapman, (2007):

- *Su duración:* corto, mediano o largo plazo.

- *El método utilizado para incorporar la muestra al sistema de ensayo:* estático, con renovación, de flujo continuo.
- *El propósito para el cual son utilizados:* control de calidad de vertidos, evaluación de compuestos específicos, toxicidad relativa, sensibilidad relativa, etc.

La toxicidad derivada de la contaminación tiene diferentes efectos sobre los organismos acuáticos y terrestres en la naturaleza. Los ensayos de toxicidad permiten establecer los límites permitidos para los distintos contaminantes, evaluar el impacto de mezclas sobre las comunidades de los ambientes que las reciben y comparar la sensibilidad de una o más especies a distintos tóxicos o a diferentes condiciones para el mismo tóxico. Los bioensayos de toxicidad se consideran como un complemento a la caracterización fisicoquímica convencional y para ello se utilizan especies de diferentes niveles tróficos de la cadena alimentaria. Son muy útiles para la investigación básica del fenómeno de toxicidad, la evaluación del impacto ambiental y del riesgo ecológico (Reish y Oshida, 1985). Los resultados obtenidos de la aplicación de los bioensayos de toxicidad han demostrado que pueden ser usados para identificar áreas de mayor o menor contaminación, también pueden ayudar a la selección de sitios para los cultivos de especies acuáticas, son utilizados en programas de monitoreo ambiental evaluando la calidad del agua y los sedimentos, así como los efluentes residuales que vierten en ríos y zonas costeras; también se han utilizado para determinar la relación entre efectos tóxicos y biodisponibilidad, para investigar interacciones entre contaminantes, determinar distribución espacial y temporal de la contaminación y evaluar los peligros del material dragado y clasificar áreas para limpieza, entre las aplicaciones más estudiadas (Ingersoll, 1995; Chapman, 2007).

Un lugar sobresaliente dentro del grupo de bioensayos más utilizados lo ocupa el ensayo de *Artemia spp.* Para la protección del ambiente marino, son necesarios métodos de ensayos ecotoxicológicos simples y confiables para determinar el impacto potencial sobre la biota marina de sustancias xenobióticas (Torokne et al., 2007). Además, la implementación correcta de medidas regulatorias, tanto en el

ámbito nacional como internacional, requiere que los métodos toxicológicos usados sean confiables y reproducibles (Iannacone y Dale, 1999).

En los bioensayos el organismo más usado es *Artemia franciscana* (Flössner, 1972), es un artrópodo, que como muchas especies de *Artemia* se han utilizado en experimentos para los ensayos de toxicidad. A pesar, de no considerarse tan sensible como instrumento de detección, tiene la ventaja de ser disponible comercialmente, eficiencia de costes, corto ciclo de vida (Kokkali et al., 2011).

Los bioensayos de toxicidad permiten evaluar el grado de afectación que una sustancia química tiene sobre organismos vivos, éstos pueden ser de tipo agudo o crónico. Las pruebas agudas cuantifican las concentraciones letales de un xenobiótico a una especie en particular, el valor obtenido se denomina Concentración Letal Media (CL_{50}) y corresponde a la cantidad de un tóxico que causa la muerte al 50% de la población experimental al cabo de un tiempo determinado, generalmente en 48 o 96 h. En contraste, los ensayos crónicos estiman la Concentración Efectiva Media (CE_{50}) o la concentración de efectos no observables (NOEC) de la sustancia en estudio que causa un efecto diferente a la mortalidad en la población experimental, al cabo de un tiempo determinado (Rodríguez y Esclapés, 1995).

La prueba CL_{50} es útil para señalar efectos sinérgicos probables de un contaminante. Es importante saber que los valores de CL_{50} son obtenidos en un tiempo determinado (24, 48 o 96h) expresados como una concentración aplicada solamente a la especie, al estado de vida y a las condiciones ambientales de la prueba (Molina, 2005).

La mayoría de los bioensayos son menos costosos y consumen menos tiempo que los estudios ecológicos. Empíricamente los bioensayos se dirigen a los problemas de interacciones de mezclas de contaminantes (Chapman, 1989).

Debe tenerse especial cuidado en las características más comunes y la selección del tipo de ensayo ecotoxicológico, para asegurar que las concentraciones en el ambiente se mantengan constantes durante largos períodos de tiempo del ensayo, así como los criterios para la selección del organismo de

ensayo. Generalmente, para los organismos acuáticos se distinguen en (Carballo et al., 2003):

Tipos de ensayos:

- *De Laboratorio*: Reproducción parcial de las condiciones reales del ambiente
- *De Campo*: Organismos mantenidos en contenedores adecuados, sometidos a las condiciones del medio.

Según sea la renovación del medio, los ensayos pueden ser:

- *Estático*: Se establece la concentración del tóxico al principio del ensayo; el medio no se renueva, ni se permite ocurra flujo.
- *Semiestático*: Renovación periódica del medio de ensayo y del tóxico cada 24 ó 48 horas
- *Flujo continuo*: Renovación continua del medio de ensayo y del tóxico.

Según el tiempo de exposición los ensayos pueden ser:

- *Agudo*: Período de exposición corto con relación al tiempo de generación del organismo de prueba
- *Subcrónico*: El período de exposición cubre, al menos, el 10% del tiempo de generación del organismo de prueba
- *Crónico*: El período de exposición cubre, al menos, una generación del organismo de prueba.
- *De Reproducción*: El período de exposición cubre, al menos, tres generaciones del organismo de prueba
- *De Recuperación*: El período de exposición es seguido por la transferencia y observación en un medio no tóxico.

Características comunes de los bioensayos:

- Exposición de grupos de organismos de la misma población en buenas condiciones de salud con aclimatación previa.
- Mantenimiento de condiciones ambientales constantes y estandarizadas.
- Exposición a concentraciones graduadas del agente.
- Grupos control adecuados.
- Observación de signos de toxicidad del efecto presentes.
- Medición y registro detallado de efectos biológicos en grupos control y tratados.
- Observación patológica de grupos control y tratados.
- Análisis estadístico de resultados.

La SEMARNAT (2007), a modo de resumen definió al bioensayo como una prueba biológica que debe de llevarse a cabo bajo condiciones estandarizadas, este ensayo establece el efecto que es producido por un agente químico o físico sobre los organismos expuestos, de modo que permite establecer los niveles permisibles para los contaminantes que son liberados al ambiente. También se presenta el caso donde el organismo es expuesto a la mezcla de estos agentes, de manera que se pueda obtener el tipo de interacción de modo sinérgicamente o antagónicamente estimando el riesgo potencialmente en ecosistemas acuáticos.

La finalidad que presentan los bioensayos es:

- Establecimiento de niveles permisibles de los contaminantes que son liberados al ambiente.
- Establecimientos de sitios prioritarios que requieren acciones de limpieza.
- Determinación de impactos ambientales que son posibles con el uso de biomarcadores.
- Evaluación y previsión del efecto que es causado por los nuevos productos químicos en el ambiente.

- Estudios de biodisponibilidad y bioconcentración de contaminantes.
- Comparación de la sensibilidad de varias especies.
- Evaluación de la efectividad de los sistemas de tratamiento de agua y el establecimiento de las condiciones óptimas de operación de plantas tratadoras.
- Evaluación de la eficiencia de los métodos de remediación.

2.8 PRUEBAS DE TOXICIDAD ACUÁTICA

Una prueba de toxicidad típica involucra un agente o estímulo (por ejemplo, un pesticida, un metal pesado o una muestra ambiental con contaminantes químicos), el cual se aplica a un organismo o grupo de organismos (por ejemplo, un cultivo bacteriano o de un alga, animales, o plantas) al que denominaremos genéricamente sujeto, sobre el que se evalúa una cierta respuesta preseleccionada. La magnitud del estímulo o dosis puede medirse como un peso, un volumen o una concentración. La respuesta del sujeto se valora mediante la cuantificación final de alguna característica (peso del cuerpo, peso del hígado, ritmo cardíaco, etcétera), el cambio de ella (aumento en el peso corporal, disminución en la presión sanguínea) o por la ocurrencia o no de un determinado fenómeno (muerte, inhibición del crecimiento, una contracción muscular, etc.) (Castillo, 2004).

Partiendo de la base de que la magnitud o la frecuencia de la respuesta dependerá de la dosis aplicada, las pruebas de toxicidad suelen diseñarse utilizando distintas dosis. La información obtenida de este tipo de ensayos permite la cuantificación de la relación entre las dos variables (dosis y respuesta), caracterizando toxicológica o ecotoxicológicamente al compuesto. Normalmente, las pruebas de toxicidad se diseñan para comparar o estimar la potencia de un agente con relación a una preparación estándar o control. Es importante destacar que la respuesta a una dosis en particular se verá afectada en mayor o menor

medida por factores no controlados durante el experimento (Castillo, 2004). Para un examen más detallado de la toxicidad acuática, Rand (1995) la clasifica en:

2.8.1 TOXICIDAD AGUDA

La toxicidad aguda para los fines de clasificación se refiere a la propiedad intrínseca de una sustancia de ser nociva para un organismo cuando éste se expone a aquella durante un tiempo corto. Generalmente se expresa en términos de una concentración que es letal para el 50% de los organismos de ensayo (CL₅₀), provoca un efecto adverso medible en 50% de esos organismos (p.ej. inmovilización en el caso de *Daphnia*, *Artemia*, etc.), o induce una reducción del 50% de las respuestas de los organismos ensayo (tratados) en comparación con organismos control (no tratados) (p.ej. la tasa de crecimiento en las algas).

Las pruebas de toxicidad aguda no pueden detectar fácilmente los efectos de compuestos que no sean letales, pero sí que retarden el desarrollo (crecimiento o reproducción) de las especies, o de compuestos que produzcan daños a nivel poblacional, lo cual puede tener un impacto ecológico considerable (Moriarty, 1988).

2.8.2 TOXICIDAD CRÓNICA

La toxicidad crónica, a efectos de clasificación, designa las propiedades potenciales o reales de una sustancia para provocar efectos adversos en organismos acuáticos durante exposiciones que se determinan en relación con el ciclo de vida del organismo. Esa toxicidad crónica se traduce habitualmente en una serie de efectos sub-letales y se expresa, por lo general, en términos de una concentración sin efecto observado (NOEC) o una CE_x equivalente. Entre los efectos observables suelen figurar la supervivencia, el crecimiento y/o la reproducción. La duración de la exposición en los ensayos de toxicidad crónica

puede variar mucho en función del efecto medido y de la especie utilizada en el ensayo.

2.9 BIOINDICADORES Y SU IMPORTANCIA

Para la evaluación de los efectos tóxicos de los contaminantes químicos es importante la adecuada elección del organismo de prueba que se empleará, pues no sólo es necesario contar con un valor de CL_{50} , sino que es también indispensable el poder inferir posibles daños sobre las comunidades acuáticas en los sistemas receptores, a partir de este resultado (Dorn et al., 1987; Chapman, 2000).

En general, los criterios de selección de especies se fundamentan en los siguientes aspectos:

- Alta y constante sensibilidad a tóxicos.
- Alta disponibilidad y abundancia.
- Estabilidad genética y uniformidad en las poblaciones.
- Representatividad de su nivel trófico.
- Significado ambiental en relación con el área de estudio.
- Amplia distribución e importancia comercial.
- Facilidad de cultivo y adaptabilidad a las condiciones de laboratorio.

Es importante destacar que no siempre puede cumplirse con todos los requerimientos señalados y, en algunos casos, la selección aparentemente mostrará algunas contradicciones. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que, en algunos procesos de selección, los investigadores, de acuerdo con cada situación, darán mayor o menor peso a ciertos criterios de selección (Dutka, 1996).

Un bioindicador (o biomarcador) se define como cualquier respuesta biológica a un químico ambiental a nivel individual, cuando se sale de un *estatus* normal. Son medidas bioquímicas, fisiológicas, histológicas, morfológicas y de comportamiento que se consideran como bioindicadores (Gil y Pla, 2001). La

razón más importante para el uso de bioindicadores en la evaluación del riesgo ambiental, es decir, en el proceso por el cual se estiman los efectos adversos de los contaminantes sobre los ecosistemas y sus componentes, con un cierto grado de certidumbre, empleando metodologías científicas, (Depledge y Fossi, 1994) es que nos pueden dar información sobre los efectos de los contaminantes.

Una ventaja de los bioindicadores es que puede mostrar que, si la fisiología del organismo se encuentra dentro de los límites normales, entonces no es necesario actuar. Por el contrario, niveles de cero, son difíciles de encontrar en determinaciones analíticas. Idealmente, ambos estudios (p. ej. residuos y bioindicadores) deben emplearse al mismo tiempo de manera integrada (Walker et al., 2006).

Los bioindicadores de contaminación, calibran la calidad del ecosistema a través de información que es recogida en el agua, en la atmósfera o en el suelo, y permiten identificar, dentro de un marco de calidad, el nivel de deterioro ambiental (Arenas, 1993). Para poder evaluar el deterioro ambiental de un ecosistema acuático debido a un contaminante es necesaria la selección de una comunidad bioindicadora de calidad de agua y el conocimiento previo de la biota que caracteriza la zona de estudio (Zúñiga de Cardoso et al., 1993).

El potencial de los organismos animales como bioindicadores en ensayos de toxicidad está ampliamente demostrado. La principal ventaja de emplearlos en investigaciones ecotoxicológicas es la de mostrar los efectos del tóxico a nivel individual y sus consecuencias posteriores para niveles superiores de organización biológica, población y comunidad (Alayo y Iannacone 2002). La información obtenida en las pruebas de toxicidad aguda y crónica mediante protocolos estandarizados es utilizada en el establecimiento de estándares de calidad acuática, límites permisibles de emisión de contaminantes y biomonitoreos (Sánchez y Vera, 2001).

Los organismos biológicos para ser usados como herramientas ecotoxicológicas requieren ser sencillos, prácticos, sensibles y repetibles (Iannacone et al., 1998; Alayo y Iannacone, 2002). Los cultivos controlados

permiten obtener individuos óptimos y saludables para las pruebas toxicológicas (Centeno et al., 1995; Lauth et al., 1995; Trottier et al., 1997); la carencia de estandarización en las condiciones de cultivo es la mayor fuente de variación de los resultados en un mismo laboratorio, así como entre laboratorios (Centeno et al., 1995; Wong y Dixon, 1995).

2.9.1 PLANCTON

El plancton es un término general que incluye bacterias, plantas y animales, e indica organismos que están suspendidos en el agua y tienen habilidades motrices limitadas o ausentes. Los organismos planctónicos están sujetos a dispersión vertical y horizontal por la turbulencia y otros movimientos del agua. La productividad biológica, depende de la capacidad del plancton marino para captar, retener y transferir el carbono. El plancton posee un rol fundamental en la regulación de los ciclos del planeta como se observa en la figura 10 (Escribano y Castro, 2013).

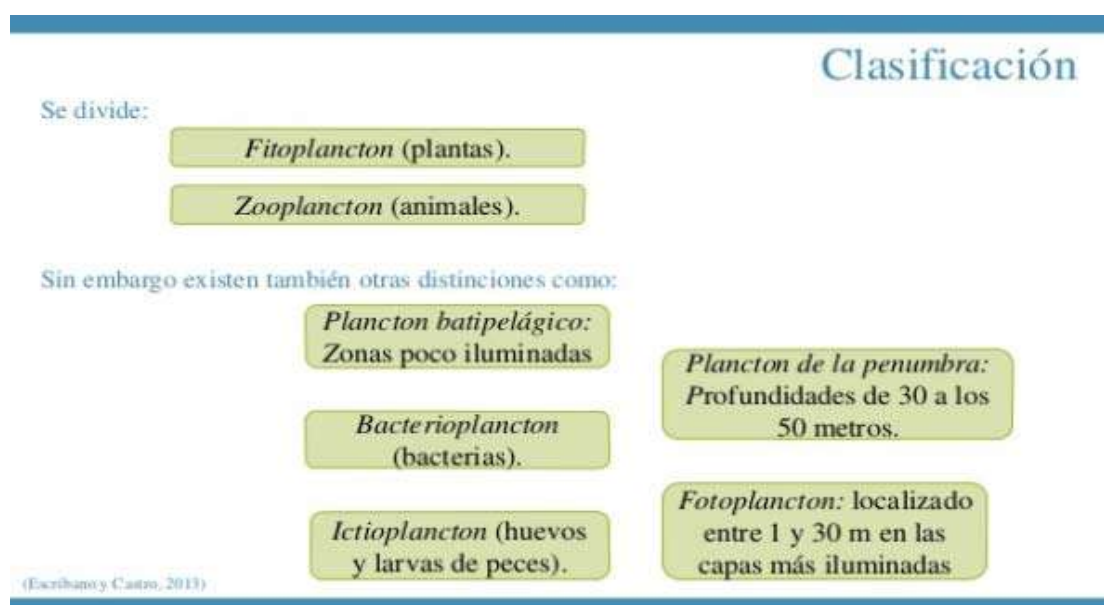


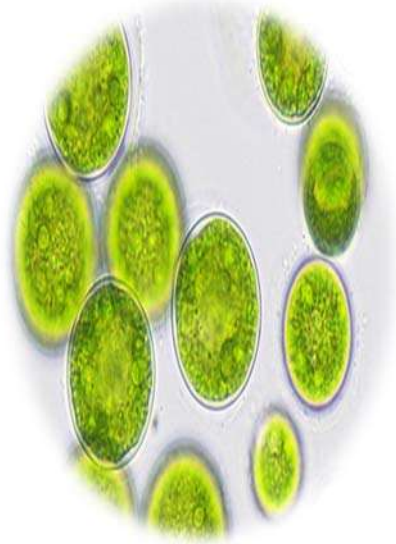
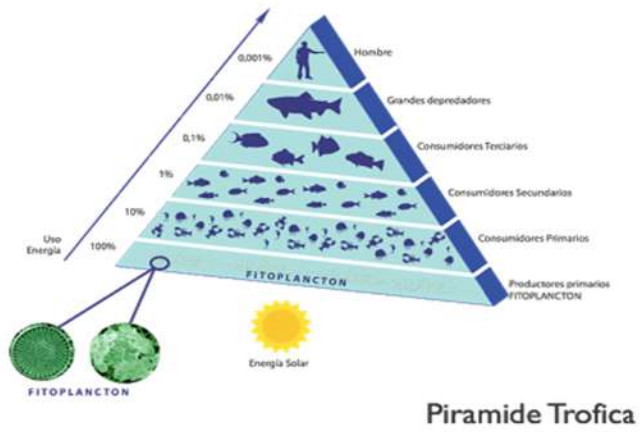
Figura 10. Clasificación del plancton (Escribano y Castro, 2013).

El **fitoplancton** se conforma de organismos fotoautótrofos los cuales consumen nutrientes y producen oxígeno; siendo productores primarios de la cadena alimentaria (figura 11), mientras que el **zooplancton** se refiere a los consumidores primarios del fitoplancton y otros microorganismos (figura 12). Zooplancton y fitoplancton son, por formar parte del primer nivel trófico en ecosistemas acuáticos, organismos idóneos para el estudio de la calidad del agua y sus repercusiones medioambientales (Menéndez, 2010).

El fitoplancton es el productor primario en lagos, convirtiendo radiación solar y carbono inorgánico en carbono orgánico a través del proceso de fotosíntesis. Los productores primarios son ingeridos por el zooplancton. En los lagos, los agentes primarios de descomposición de materia orgánica tienden a ser las bacterias que, a su vez, se constituyen en alimento del zooplancton. Aunque el proceso no está totalmente comprendido, está ampliamente aceptado que las bacterias juegan un rol principal en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes inorgánicos y orgánicos y en la transferencia de energía en lagos. La productividad del lago depende, además de las fuentes de nutrientes (nitrógeno y fósforo), de la cantidad de oxígeno y el tiempo de retención del agua (Menéndez, 2010).

En este contexto, el zooplancton, es usualmente más denso que el agua y tiende a hundirse. La turbulencia, y otros procesos del agua, lo mueven en planos verticales y horizontales y producen su dispersión no aleatoria a través de la zona pelágica. No obstante, aunque sujetos a estos mecanismos físicos en aguas abiertas, muchos miembros de este grupo pueden moverse extensivamente en partes quietas y generar migraciones verticales diarias. El zooplancton tiene tiempos de generación de entre 1 hora y 10 días (los tiempos de generación de los peces están en el rango 10 días a varios años) (Menéndez, 2010). Como se mencionó en el apartado anterior, organismos zooplanctónicos son utilizados como bioindicadores en la calidad de agua, en este caso *Artemia* como organismo representante zooplanctónico de ecosistemas estuarinos y marinos.

Fitoplancton



Piramide Trófica

Primer eslabón en la cadena trófica del mar

Figura 11. Fitoplancton (Escribano y Castro, 2013).



Figura 12. Zooplancton (BIOSIMA S.R.L., 2014).

2.10 ARTEMIA FRANCISCANA

Artemia franciscana es una especie distribuida en los lagos de agua salada y mares de todo el mundo (Brito et al., 2006). Esta especie es capaz de depositar huevos que constan de un quiste integrado por aproximadamente 4000 células, las cuales le confieren gran resistencia en condiciones extraordinarias de estrés fisiológico (Amons et al., 1997). Mientras los huevos permanezcan bajo condiciones de estrés, estarán metabólicamente inactivos (letargo); una vez dadas las condiciones ambientales específicas, los huevos reanudan su metabolismo y desarrollo, hasta finalmente emerger en forma de nauplios (Liang y MacRae, 1999).

El desarrollo del embrión hasta la eclosión dura aproximadamente 24 horas en condiciones adecuadas, llegando a su fase adulta en 20-30 días de vida libre, favoreciendo su uso en estudios de toxicidad aguda (Andriolli et al, 2007).

El estatus taxonómico del género *Artemia* es el siguiente (Martin y Davis, 2001):

- Subfilo: Crustacea (Brünnich, 1772)
- Clase: Branchiopoda (Latreille, 1817)
- Subclase: Sarsostraca (Tasch, 1969)
- Orden: Anostraca (Sars, 1867)
- Familia: Artemiidae (Grochowski, 1896)
- Género: *Artemia* (Leach, 1819)

2.10.1 ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN

Diferentes cepas geográficas de *Artemia* se adaptaron a condiciones muy variadas, como temperaturas del agua entre 6 y 35 °C, y aguas ricas en cloruros,

sulfatos y carbonatos, de hasta 250 g/L, es decir, siete veces más que el contenido del agua de mar (Sorgeloos et al., 1986). *Artemia* tiene ciertas características que le permiten adaptarse en forma extraordinaria a la vida en aguas hipersalinas, entre ellas (Triantaphyllidis et al., 1998):

- a) Tener sistemas fisiológicos eficientes que le confiere resistencia a altísimas concentraciones de sal.
- b) Tener una capacidad de adaptarse a los bajos niveles de oxígeno disuelto que existen en los ambientes hipersalinos puede sintetizar pigmentos respiratorios, incluida la hemoglobina.
- c) Tener la posibilidad de producir formas de resistencia (cistes o quistes) que pueden sobrevivir a largos períodos de absoluta sequía.

Aunque *Artemia* tiene capacidad de vivir en concentraciones salinas como las del mar (35 g/L o menores), carece de mecanismos de defensa eficaces contra los predadores, lo que convierte a esta especie en una presa fácil para otras especies carnívoras (peces, crustáceos o insectos). Por ello, es más común en aguas hipersalinas, donde sus predadores no consiguen prosperar (Sorgeloos et al., 1986).

2.10.2 MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA

Artemia tiene la particularidad de presentar criptobiosis, quistes secos inactivos manteniéndose así tanto tiempo como permanezcan secos. Una vez puestos en agua de mar, los quistes bicóncavos se hidratan tomando forma esférica y el embrión recobra su metabolismo reversible interrumpido. Tras unas 24 horas la membrana externa de los quistes se rompe (“breaking”) y aparece el embrión rodeado de la membrana de eclosión. Durante las horas siguientes, el embrión abandona completamente la cáscara del quiste: colgando entretanto de la cáscara vacía a la cual permanece todavía unido (estado de “umbrella”). Dentro de la membrana de eclosión se completa el desarrollo del nauplio, sus apéndices comienzan a moverse y en un breve periodo de tiempo la membrana de eclosión

se rasga (= “hatching”) emergiendo el nauplio que nada libremente (Figura 13) (Sorgeloos et al., 1986).

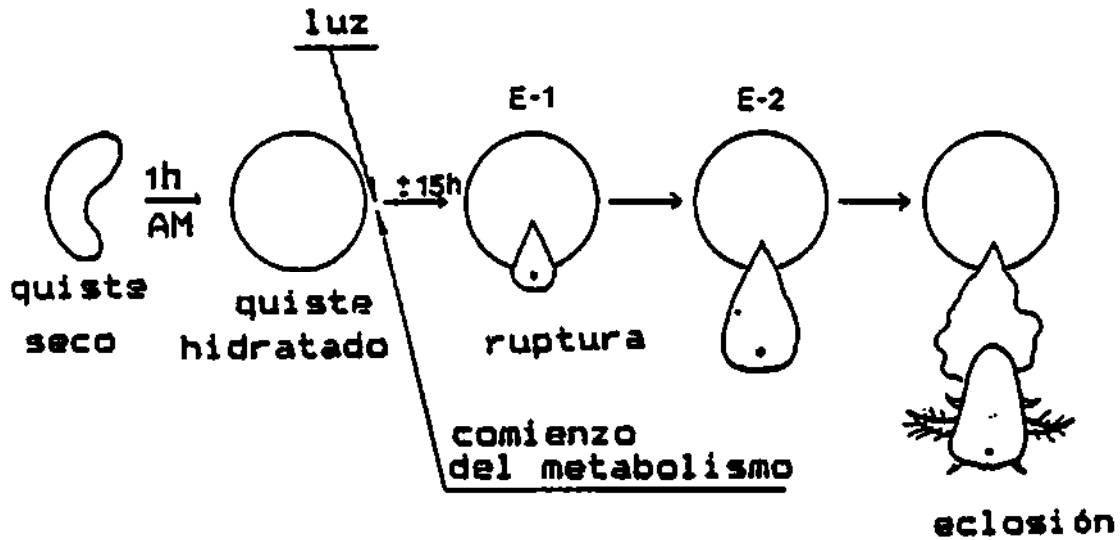


Figura 13. Desarrollo del quiste de *Artemia* desde la incubación en agua marina hasta la liberación del nauplio (Sorgeloos et al., 1986).

El primer estadio larvario (también llamado estadio I) mide entre 400 y 500 micras de longitud, tiene un color pardo anaranjado y posee tres pares de apéndices: el primer par de antenas (también llamadas anténulas y que tienen una función sensorial) el segundo par de antenas (con función locomotora y filtradora) y las mandíbulas (con una función de toma de alimento). Un único ocelo de color rojo también llamado ojo naupliar se encuentra situado en la cabeza entre el primer par de antenas. La cara ventral del animal se encuentra cubierta por un amplio labro que interviene en la toma de alimento. El estadio larvario I no se alimenta ya que su aparato digestivo no es todavía funcional (permaneciendo aún cerrados la boca y el ano) (Sorgeloos et al., 1986).

Tras aproximadamente 24 horas, el animal pasa al segundo estadio larvario (también llamado estadio II). Pequeñas partículas alimenticias (tales como células de microalgas, bacterias, detritus) con un tamaño que varía entre 1 y 40 micras

son filtradas por el segundo par de antenas, siendo entonces ingeridas por un aparato digestivo ya funcional (Sorgeloos et al., 1986).

La larva continúa su crecimiento apareciendo diferenciaciones a lo largo de las 15 mudas. Así van apareciendo unos apéndices lobulares pares en la región torácica que se diferenciarán posteriormente en toracópodos, se desarrollan ojos complejos laterales a ambos lados del ojo naupliar. Desde el estado X en adelante, se producen importantes cambios tanto morfológicos como funcionales, por ejemplo: las antenas pierden su función locomotriz y se transforman en elementos de diferenciación sexual. Los futuros machos desarrollan unos apéndices curvados y prensiles mientras que las antenas de las hembras degeneran en apéndices sensoriales (Sorgeloos et al., 1986).

Los adultos se caracterizan por un cuerpo alargado con dos ojos complejos pedunculados, un aparato digestivo lineal, unas anténulas sensoriales y 11 pares de toracópodos funcionales. El macho posee un par de piezas prensiles musculadas muy características (segundo par de antenas) en la región cefálica mientras que en la parte posterior del tórax se puede observar un par de penes. La hembra de *Artemia* no tiene apéndices distintivos en la región cefálica, pero puede ser fácilmente reconocida por el saco de puesta o útero que está situado inmediatamente detrás del undécimo par de toracópodos (Figura 14) (Sorgeloos et al., 1986).

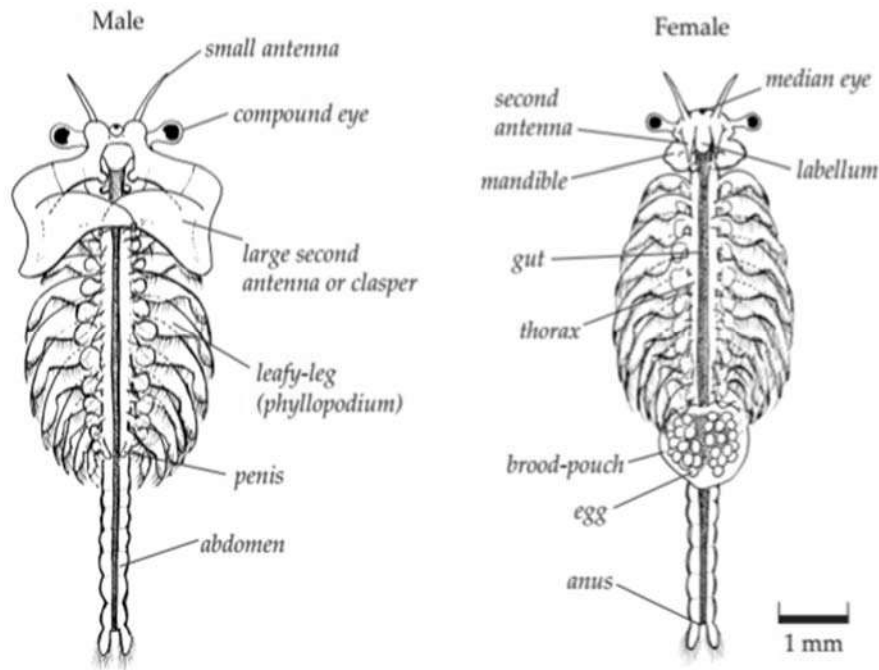


Figura 14. Diferencias morfológicas entre macho y hembra de Artemia (Dockery y Tomkins, 2000).

Los huevos fecundados se desarrollan normalmente en nauplios nadadores (= reproducción ovovivípara) que son depositados por la hembra. En condiciones extremas (salinidad elevada, bajos niveles de oxígeno) las glándulas de la cáscara entran en actividad y acumulan un producto de secreción de color marrón. Los embriones solo se desarrollan hasta el estado de gástrula, momento en el cual son rodeados de una gruesa cascara (segregada por las glándulas de la cáscara), entrando en un estado de latencia o diapausa (= parada reversible del metabolismo embrionario) y siendo liberados por la hembra (= reproducción ovípara) (Figuras 15 y 16) (Sorgeloos et al., 1986).

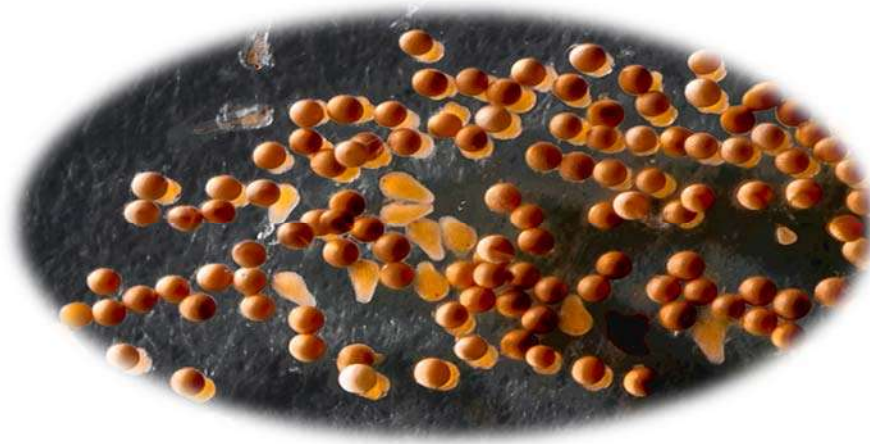


Figura 15. Huevos fecundados de *Artemia* (Martín, 2015).

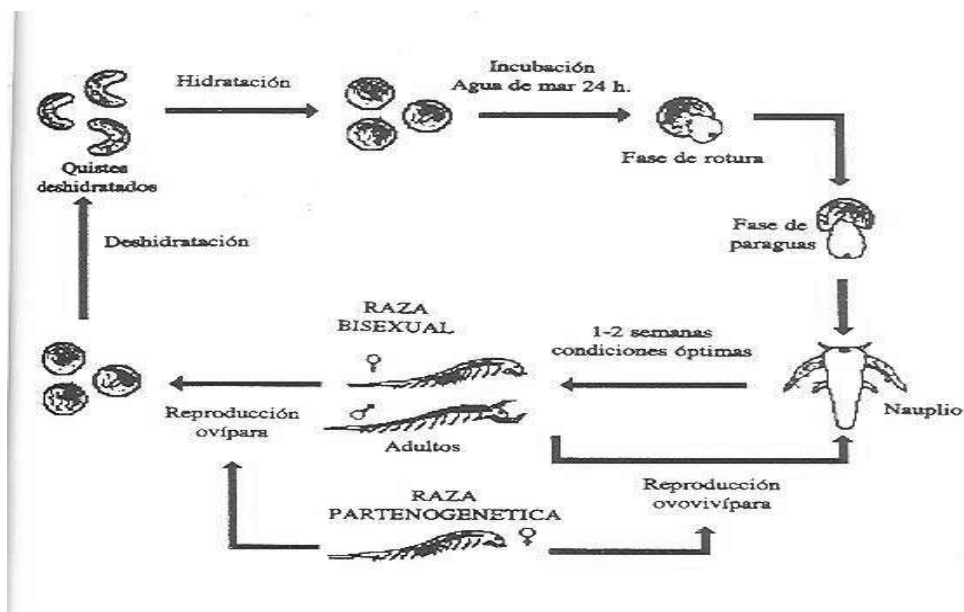


Figura 16. Reproducción ovípara u ovovivípara de *Artemia* (Rivero, 2015).

En condiciones adecuadas esta especie puede vivir varios meses, creciendo de nauplio a adulto en solo 8 días y reproduciéndose a una tasa de hasta 300 nauplios o quistes cada 4 días (Diagrama 1) (Sorgeloos et al., 1986).



Diagrama 1. Ciclo de vida de *Artemia franciscana*.

2.10.3 MORFOLOGÍA Y METABOLISMO DE LOS QUISTES

De acuerdo con la revisión de Clegg y Conte (1980); un esquema de la ultraestructura de un quiste de *Artemia* está representado en la figura 17.

La cáscara del quiste está formada de tres estructuras:

- **El corión:** Capa dura formada de lipoproteínas impregnadas de quitina y hematina. La principal función del corion es la de proporcionar una protección adecuada al embrión contra rupturas mecánicas y radiaciones (ej. las radiaciones ultravioletas de los rayos solares).
- **La membrana cuticular externa:** membrana compuesta de varias capas y con una función de filtro muy especial, actuando como barrera de permeabilidad).
- **La cutícula embrionaria:** Una capa transparente y altamente elástica que queda separada del embrión por la membrana cuticular interna (que se transforma en membrana de eclosión durante el proceso de incubación).

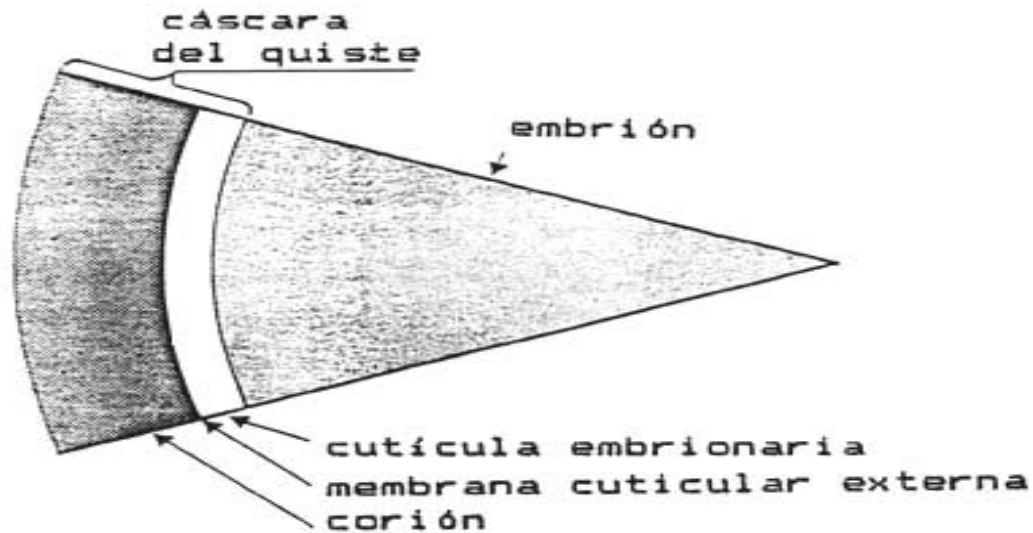


Figura 17. Esquema de la ultraestructura de un quiste de Artemia (Clegg y Conte, 1980).

Los quistes secos son altamente higroscópicos, incorporando agua a gran velocidad, por ejemplo, en las primeras horas el volumen del embrión hidratado aumenta más de un 100%. Una vez completamente hidratado se puede iniciar el metabolismo activo a condición de que los quistes estén suficientemente iluminados. A intensidades de luz demasiado bajas, la tasa de eclosión se retrasa o simplemente no se produce (Clegg y Conte, 1980).

El metabolismo aeróbico en el embrión enquistado asegura la conversión de la trealosa, como carbohidrato de reserva, en glicógeno (como fuente de energía) y glicerol que son acumulados por el embrión en la membrana cuticular externa. El incremento en la concentración de un producto altamente higroscópico como es el glicerol ocasiona un mayor aumento en la asimilación de agua por el embrión a través de la membrana cuticular externa. Como consecuencia de este fenómeno se produce un aumento de la presión osmótica en el interior de la membrana cuticular externa hasta que se alcanza un punto crítico, momento en el cual se produce la ruptura de esta membrana y de la cáscara del quiste (= "breaking") (Clegg y Conte, 1980).

2.10.3.1 INFLUENCIA DE LA SALINIDAD EN LA ECLOSIÓN

La ruptura de la cáscara va acompañada de la liberación de todo el glicerol al medio de cultivo. La ruptura se puede producir en ausencia de sales y que a medida que aumentan los niveles de salinidad en el medio de eclosión, se necesitan mayores concentraciones de glicerol para alcanzar el punto crítico de presión osmótica necesario para que se produzca la ruptura de la cáscara (por diferencia entre la presión osmótica dentro y fuera del quiste). De esta forma cuanto mayor es la salinidad en el medio, mayor cantidad de glicerol tiene que ser producido, alargándose con ello el período de eclosión y de ruptura y disponiendo de menos reservas energéticas para el nauplio (Clegg y Conte, 1980).

2.10.3.2 TOLERANCIA A LA TEMPERATURA

Los quistes secos (con un contenido en agua entre el 2 y el 5%) son muy resistentes, por ejemplo, la viabilidad de la eclosión no se ve afectada en un intervalo de temperatura entre -273 y 60°C pudiendo tolerar hasta 90°C si las exposiciones son de breve duración (en realidad las exposiciones deberán ser más cortas a medida que la temperatura aumenta) (Clegg y Conte, 1980).

Los quistes hidratados (completamente hidratados en el medio de cultivo) tienen una tolerancia a la temperatura muy específica (ver esquema en la figura 18) (Clegg y Conte, 1980):

- Una interrupción del metabolismo (= muerte del embrión) se produce por debajo de -18°C y por encima de 40°C.
- Una interrupción reversible del metabolismo se produce (= sin que la viabilidad se vea afectada) en un intervalo de temperaturas que varía entre 18°C y 4°C y entre 32°C y 40°C (una exposición de larga duración a este último intervalo de temperaturas ocasiona un retraso progresivo de la tasa de eclosión).

- El metabolismo activo actúa en el intervalo de temperatura entre 4 y 32°C; aunque si bien el porcentaje de eclosión permanece constante, los nauplios eclosionan antes a medida que la temperatura es más alta.

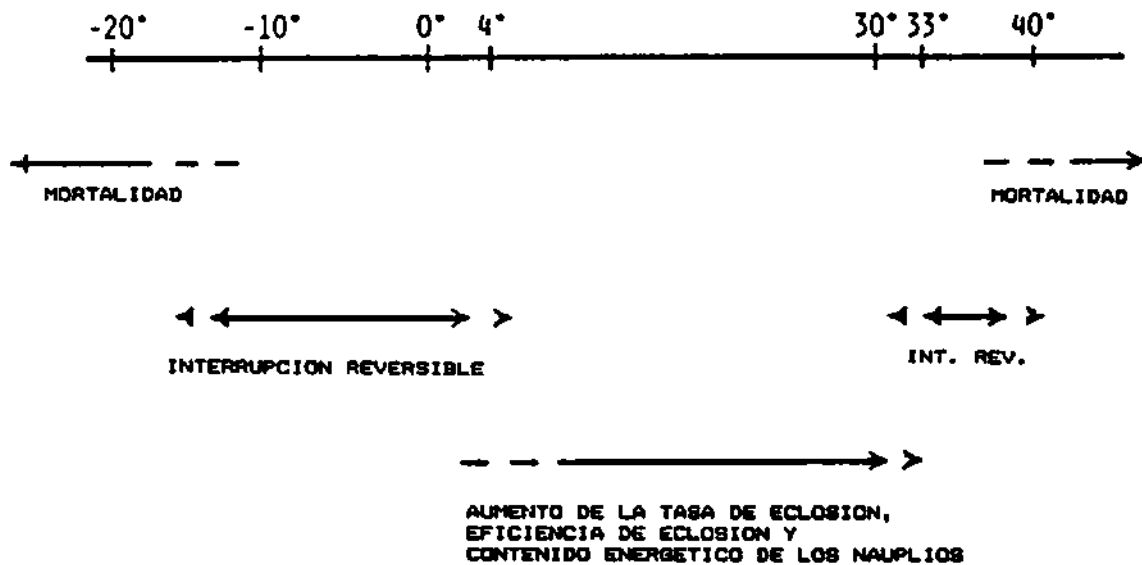


Figura 18. Diagrama esquemático del efecto de las temperaturas del agua sobre el metabolismo del quiste de *Artemia* (Clegg y Conte, 1980).

2.11 BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA EN ARTEMIA FRANCISCANA

La realización de bioensayos de toxicidad aguda tiene por objeto clasificar las sustancias de acuerdo con su peligrosidad. En este sentido, pese al avance en los conocimientos toxicológicos y la mayor frecuencia de intoxicaciones crónicas, es considerada la DL_{50} (en nuestro caso la CL_{50}), como un indicativo clave en ciertas legislaciones, para determinar la capacidad tóxica de muchas sustancias (Repetto y Repetto, 2010) razón por la cual, es necesario garantizar la reproducibilidad y confiabilidad de dichos estudios, por lo tanto, la elección del organismo indicador es de mucha importancia, razón por la cual, para este ensayo fue empleada la

especie *Artemia franciscana*, que gracias a sus condiciones fisiológicas y de desarrollo, favorece su uso en estudios de toxicidad aguda (Andriolli et al., 2007).

El ensayo de *Artemia* spp. tiene las ventajas de ser más rápido (24 horas), barato y sencillo (no se requieren técnicas asépticas). Se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, no necesita equipamiento especial y se emplean pequeñas cantidades de muestras (2-20mg o menos) (McLaughlin et al., 1998).

Las ventajas de *Artemia* como la mejor “primera elección” para estudios de toxicidad en el medio marino pueden resumirse como sigue (Vanhaecke et al., 1981):

- Los quistes están comercialmente y fácilmente disponibles para que los ensayos puedan llevarse a cabo en todo el mundo con el mismo material original y sin ningún problema de provisión, por otra parte, la cantidad de quistes requeridos por ensayo es muy pequeña para que el precio del material biológico sea insignificante;
- Se elimina por completo la necesidad de mantener durante todo el año los cultivos de stock, con todas las dificultades biológicas y técnicas y las considerables repercusiones económicas;
- Gran número de organismos de prueba exactamente de la misma edad y condición fisiológica se puede obtener fácilmente para iniciar las pruebas.

Como regla general podemos decir que el nivel de salinidad más bajo en el que se encuentra *Artemia* varía de un lugar a otro y está determinado por el nivel de tolerancia a la salinidad superior del depredador local. Por último, pero no por ello menos importante, *Artemia* se cultiva a nivel internacional para fines de investigación fundamental, así como para aplicaciones de acuicultura en agua salina a una concentración de 35g/L produciendo descendientes que pueden cultivarse en diferentes generaciones (Vanhaecke et al., 1981).

Según Vanhaecke y Persoone (1984) los aspectos que deben ser considerados para desarrollar una prueba de *Artemia* spp estándar son los siguientes:

- Utilizar los estadios larvales tempranos para pruebas de toxicidad aguda,
- Los quistes tienen que eclosionar bajo condiciones estrictamente controladas de temperatura (28°C), salinidad (3.5%), aireación (constante), luz (1000 lx) y pH (8.2±0.2),
- Las larvas tienen que ser exactamente de la misma edad al inicio de cada prueba,
- Durante la prueba, la larva no debe transformarse en otro estadio con una sensibilidad diferente,
- Las pruebas deben realizarse con quistes del mismo origen geográfico,
- Las condiciones experimentales de la prueba tienen que ser definidas con gran exactitud,
- Se realiza un ensayo de control con un producto químico tóxico de referencia cada vez en paralelo para comprobar tanto la sensibilidad de las larvas como la conformidad con el procedimiento tecnológico estándar.

Los ensayos de toxicidad con *Artemia* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, y extracciones de sedimentos, entre otros (Vanhaecke y Persoone, 1984).

En las pruebas de toxicidad con *Artemia* los nauplios de aproximadamente 24 h de edad (Instar II o III) son expuestos a la muestra o compuesto a probar, por un período de 48 h, al término del cual se cuantifica el número de organismos muertos. Con estos resultados se establece la proporción o porcentaje de mortalidad producida (Vanhaecke y Persoone, 1984).

2.12 LEGISLACIÓN

En México, es muy reciente la implementación de un programa de monitoreo ambiental. El Programa Nacional de Monitoreo y Evaluación Ambiental de sustancias tóxicas, persistentes y bioacumulables (PRONAME) responde a la necesidad de generar información sobre sustancias seleccionadas por su pertinencia a nivel nacional e importancia a nivel global, para la definición de políticas en materia de identificación, reducción y en su caso eliminación de riesgos a la salud y al medio ambiente (INE, 2007).

El uso de los estudios ecotoxicológicos tiene muchas aplicaciones en la protección ambiental; México cuenta con un número limitado de pruebas que se encuentran validadas y legisladas entre las que se encuentran: en el bioensayo de Microtox (SCOFI, 1995a) que utiliza a *Vibrio fischeri* como bioindicador luminiscente, *Artemia salina* (SCOFI, 1995b) y la recientemente modificada prueba con *Daphnia magna* (SCOFI, 2010).

La norma mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI es aplicable para la evaluación de toxicidad aguda en cuerpos de agua salobres y marinos, así como aguas residuales industriales, municipales y agrícolas, lixiviados, sustancias puras o combinadas y extractos acuosos con salinidades mayores a diez. Además, dicha norma establece el método biológico para la evaluación de la calidad del agua mediante pruebas de toxicidad aguda utilizando *Artemia franciscana*, microcrustáceo que cumple el papel de bioindicador, combinando rapidez, confiabilidad y bajo costo.

El gobierno federal impulsó por algunos años el análisis de las pruebas que más conviniera al país, el resultado fue un libro de protocolos que incluye pruebas para agua dulce y marina, así como para suelos (Ramírez-Romero y Mendoza-Cantú, 2007); también financió un ejercicio de intercalibración de dos pruebas para agua dulce (Mendoza-Cantú et al., 2011).

En los EUA, el Programa del Sistema Nacional de Eliminación de las Descargas de Contaminantes (NPDES, por sus siglas en inglés) tiene como objetivo controlar las descargas tóxicas, implementar estándares de calidad del agua y restaurar y

mantener la calidad de los sistemas acuáticos de tal manera que puedan ser usados para actividades recreativas entre las que se incluyen la natación y la pesca (EPA, 2004).

La EPA (1986), la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2002) y la OMS (2003) hacen una recopilación de estándares para el hierro sin hacer mención de los bioindicadores utilizados, el límite común de 0.3mg/L a 0.2 mg/L, y en algunos países estos límites no son respetados y sobrepasan al considerar como permisible 0.7mg/L. La EPA lo clasifica como contaminante secundario.

El Reglamento de Vertido y Reúso de Aguas Residuales y el Reglamento para la Calidad del Agua Potable (Compendio de cuatro reglamentos, 1999) limita la cantidad de turbidez, color y el contenido de sólidos suspendidos en el agua, ya sea para descarga o consumo humano.

3. JUSTIFICACIÓN

Una de las problemáticas ambientales emergentes en el país se refiere al uso indiscriminado de químicos en diversas actividades industriales, lo cual se traduce a riesgos sanitarios y ambientales importantes. Desarrollar métodos de evaluación ecotoxicológica en ecosistemas marinos y de estuario es también una necesidad incluida en el Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (IPCS, por sus siglas en inglés) de las Naciones Unidas.

El desarrollo del presente trabajo está basado en establecer una metodología básica y sencilla para evaluar el riesgo medioambiental, provocado por la presencia de sulfato ferroso (FeSO_4) que puede estar presente en los vertidos y efluentes provenientes del tratamiento de coagulación de aguas residuales, ante variaciones de pH, utilizando como bioindicador nauplios de *Artemia franciscana*. En adición, los parámetros fisicoquímicos del agua, precisamente el pH influye sobre la biodisponibilidad, solubilidad, precipitación, especiación y la toxicidad de los metales presentes. Esto dificulta la evaluación de la respuesta del hierro debido a las diferentes formas inorgánicas o en la formación de complejos orgánicos con la materia orgánica que puede presentarse en la columna de agua.

En este contexto, los organismos zooplanctónicos ocupan una posición central en las cadenas tróficas pelágicas, debido a que presentan ciclos de vida cortos y facilidad de cultivo. Entre los principales *taxa* del zooplancton se encuentran los protozoarios, los cladóceros, los copépodos y los rotíferos. El género *Artemia* ha sido ampliamente utilizado para estudios de toxicidad aguda y crónica, tanto en su estado embrionario como en sus formas larvarias, presentándose como organismos bioindicadores de gran utilidad para estudios ecotoxicológicos en el medio acuático lo cual queda refrendado en la norma mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI explicable para la evaluación de toxicidad aguda en cuerpos de agua salobres y marinos.

4. HIPÓTESIS

El sulfato ferroso vertido en aguas residuales presenta mayor potencial de riesgo toxicológico a pH bajos sobre las poblaciones zooplanctónicas de los ecosistemas acuáticos salinos.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evidenciar el riesgo tóxico a corto plazo del sulfato ferroso, a través de exposiciones sobre poblaciones de *Artemia franciscana*, ante variaciones de pH comprendidas entre 4.5 y 8.5.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto tóxico agudo del sulfato ferroso (FeSO_4) a través de la determinación de la CL_{50} a 24 horas ante pH control de 8.5.
- Evaluar el impacto que supone la presencia del sulfato ferroso (FeSO_4) al determinar el efecto tóxico agudo a diferentes valores de pH del medio (4.5, 5.5 y 6.5), evaluando la CL_{50} a 24 horas de exposición del xenobiótico.
- Establecer la máxima concentración donde no se observa respuesta de letalidad sobre *Artemia franciscana* (24h-NOEC) como un índice de seguridad del compuesto.
- Comparar estadísticamente la CL_{50} obtenida en las variaciones de pH con respecto al pH control.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 PREPARACIÓN DE AGUA MARINA SINTÉTICA

La preparación de agua marina se realizó a partir de sal marina obtenida de Sera (Sera Premium, Sera Germany), especialmente preparada mediante suplementación de calcio y oligoelementos para un mejor cultivo de algas e invertebrados de agua salada. Este preparado se presenta libre de nitratos, fosfatos y silicatos, y lleva adicionados quelatos especiales que contribuyen a la detoxificación de metales pesados como el cobre.

Para la preparación de agua marina reconstituida (Diagrama 2), se disolvió dicha sal marina en agua destilada (Milli-Q) hasta alcanzar una concentración del 3.5 % y una densidad de 1.022-1.024 gr/L. El agua marina así reconstituida era posteriormente aireada y removida mediante bomba sumergible durante 24 horas, para conseguir las condiciones apropiadas de oxígeno y dióxido de carbono. Finalmente, el agua marina reconstituida era filtrada mediante filtros de celulosa de 30 μm (Millipore).

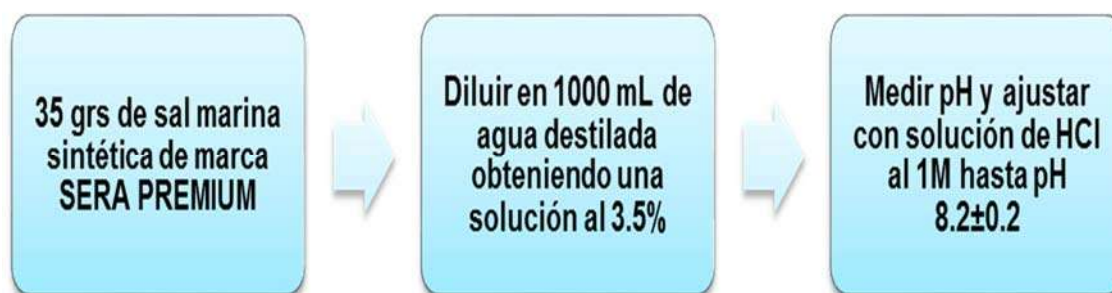


Diagrama 2. Metodología para preparar el agua marina reconstituida.

6.2 MATERIAL BIOLÓGICO

La obtención de nauplios de *Artemia franciscana* se realiza a partir de huevos desecados obtenidos de Argent (Argent Chemical Laboratories, Washington, USA) y utilizando la línea ARGENTEMIA Grade II Silver Label, línea procedente del North Arm Great Salt Lake (USA) y que garantiza un mínimo de 260.000 huevos/gr de los cuales más de un 92% eclosionarán en un intervalo para el tiempo de inducción de mínimo (T0) 9 horas y máximo (T90) 16 horas, obteniendo así poblaciones homogéneas de nauplios, de las que al menos un 80% tenían un tamaño de 500-525 μm .

Para la obtención de nauplios se pesaron 0.1g de *Artemia franciscana* y se incubaron durante 24h en 150mL de agua marina sintética en artemiero, manteniendo una oxigenación constante mediante una bomba de aireación y con las siguientes condiciones en el baño térmico (Tabla 5):

Tabla 5. Parámetros para una óptima eclosión de nauplios de *Artemia franciscana*.

PARÁMETROS	CONDICIONES
pH	8.2 $\pm$ 0.2
Salinidad	3.5% (35 g/L)
Temperatura	28°C
Luz	1000 lx

6.3 SUSTANCIA EMPLEADA EN EL BIOENSAYO

Se preparó una solución de FeSO_4 disolviendo 50 mg de reactivo en 1mL de agua destilada, posterior a ello, se realizó una dilución 1:10 para obtener concentraciones crecientes (15-75 mg/L), y así determinar la letalidad del sulfato ferroso a 24h.

6.4 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL SULFATO FERROSO EN NAUPLIOS DE *ARTEMIA FRANCISCANA*

La metodología para la determinación de la Concentración Letal 50% (CL_{50}) se basa en la descrita por Persoone et al. (1989), que consiste en determinar la concentración que causa la muerte del 50% de nauplios de 24h de *Artemia* sobre placas de cultivo celular de 24 pocillos (Sarstedt Inc., USA).

6.4.1 DISTRIBUCIÓN DE NAUPLIOS DE *ARTEMIA*

Los nauplios de *Artemia* una vez obtenidos, se distribuyen en un conjunto de 10 individuos por cada uno de los 24 pocillos existentes en cada una de las placas multipocillo utilizadas (figura 19). Para ello, un conjunto de nauplios procedentes del total de nauplios obtenidos serán separados del resto y se transfieren a una nueva placa de Petri, teniendo cuidado de traspasar el menor volumen de medio salino posible. Seguidamente, y por medio de una pipeta Pasteur, un conjunto de 10 nauplios se introduce en cada uno de los pocillos, realizando una confirmación posterior a su traslado, bajo lupa binocular, para asegurarnos de que cada pocillo posea el número exacto de nauplios.

Para la realización de las posteriores exposiciones a la sustancia ensayada, la columna 1 de la placa multipocillos quedaría reservada para los estudios control (sin exposición al compuesto).



Figura 19. Placas de cultivo celular de 24 pocillos.

6.4.2 EXPOSICIONES PREVIAS

Se realizaron ensayos de toxicidad previos, con el fin de determinar los valores de concentración letal mínima (CLmin) y concentración letal máxima (CLmax).

Para su obtención, se realizaron ensayos sobre placas multipocillo, a concentraciones crecientes del tóxico. Así, con posterioridad a la exposición, las placas multipocillo serán incubadas a 28°C en una cámara de cultivo, en ambiente de oscuridad y durante un período de 24 horas. Pasado este tiempo, se realizará la lectura de la placa en un estereoscopio, contabilizando el número de nauplios vivos y muertos en cada uno de los pocillos. En este sentido, y con el fin de establecer parámetros similares para todos los estudios, se considera que un nauplio está muerto cuando no exhibe ningún tipo de movimiento, ni interno ni externo, durante un período de observación de 10 segundos (figura 20).



Figura 20. Nauplios muertos de *Artemia franciscana* observados en el estereoscopio (Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de QFB. UMSNH).

Para la validación de cualquier ensayo realizado, es necesario que los datos obtenidos en las columnas control, fueran iguales o superaran el 90% de supervivencia de nauplios, descartando todo aquel ensayo que no superara este requisito.

De esta forma, se obtienen las CLmin y CLmax correspondientes y en la sustancia ensayada, siendo la primera la máxima concentración ensayada capaz de no provocar efecto letal a ningún individuo expuesto en los cuatro pocillos correspondientes a la columna empleada para dicha concentración, y la segunda la menor concentración capaz de provocar efecto letal a todos los individuos expuestos en los cuatro pocillos correspondientes a la columna empleada para esa concentración.

De esta forma, quedarán establecidos los rangos de concentración que posteriormente serían aplicados para los diferentes ensayos de toxicidad aguda.

6.4.3 EXPOSICIONES FINALES

Una vez que se establecen las correspondientes CLmin y CLmax, se practicaron las correspondientes exposiciones al tóxico y también a los diferentes pH, aplicando un total de 5 concentraciones dentro del rango establecido, que corresponderían a las columnas 2 a 6 de la placa multipocillos, y reservando a la columna 1 como control, para el estudio de letalidad. En cada pocillo se colocan 10 nauplios de 24h de *Artemia* los cuales son expuestos a las distintas concentraciones del agente químico en un volumen total de 1ml (1000µl). Para cada concentración del agente químico se establece un control y cuatro repeticiones con un número de ensayos a 12, se incuban las placas a 28°C por 24h. La observación del grado de toxicidad de los nauplios a las diferentes concentraciones se realizó por medio del estereoscopio a las 24h de exposición en un ambiente de oscuridad, para determinar su mortalidad y la carencia de movilidad a los 10 segundos de observación (Iannacone, 2007).

Para llevar a cabo el bioensayo, fue necesario realizar un control para verificar el rango de pH en el cual el bioindicador permanecía vivo y estableciendo como mínimo un pH ácido de 4.5. Se preparó agua marina a diferentes pH (4.5; 5.5 y 6.5), en cada una se diluyó la solución de FeSO₄ respetando las concentraciones crecientes (15, 25, 35, 50 y 75 mg/L) para la exposición a 24h, llevando a cabo los 12 ensayos para cada pH.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La estimación de las LC₅₀₍₂₄₎ y NOEC se realizó por regresión no lineal mediante curvas Concentración-Respuesta, para posteriormente calcular los

logaritmos de las concentraciones finales de cada valor de pH, relacionando con el porcentaje de mortalidad (% mortalidad vs log concentración). Para determinar la respuesta de mortalidad se realizó un test de normalidad.

La prueba de Distribución Normal de los datos se realizó mediante la prueba D'Agostino y Pearson. Posteriormente se aplicó la prueba de ANOVA (1 vía) Test de Tukey para la comparación múltiple de las concentraciones de los pH ácidos (4.5, 5.5 y 6.5) de manera individual, así como del pH control (8.5) utilizando un intervalo de confianza de $p < 0.05$.

Los cálculos estadísticos se realizaron a través del paquete estadístico Graphpad Prism v5.0 (Graph-Pad Software Inc., USA), en el cual se obtienen las gráficas de las pruebas realizadas.

8. RESULTADOS

Se obtuvo la toxicidad aguda a 24h de exposición del sulfato ferroso sobre nauplios de *Artemia franciscana* mediante la determinación de la respuesta CL_{50} de cada pH ensayado realizando 12 bioensayos para cada uno, obteniendo los siguientes resultados:

a) pH 4.5

En la tabla 6 se observan los valores obtenidos de CL_{50} y NOEC a 24h del $FeSO_4$ a pH de 4.5; donde podemos apreciar que de manera experimental con diferencias estadísticamente muy significativas ($p < 0.0001$) con respecto al pH control 8.5 del cual se obtuvo una CL_{50} de 172.98 mg/L. De igual manera, el valor

de NOEC disminuye a 7.05 mg/L, por lo tanto, a pH 4.5 con respecto al control, es tóxico a corto plazo.

Tabla 6. Índices de toxicidad a 24h de exposición con sulfato ferroso a pH 4.5

Índices de toxicidad	Valores mg L ⁻¹ (L.C. 95%)
24h-NOEC	7.05 (0.44-13.84)
CL ₅₀ (24)	43.25 (30.13-83.34)

En el gráfico 1 se observa una curva concentración-respuesta a 24h del sulfato ferroso a un pH de 4.5, la cual indica que conforme aumenta la concentración del tóxico va aumentando el porcentaje de letalidad.

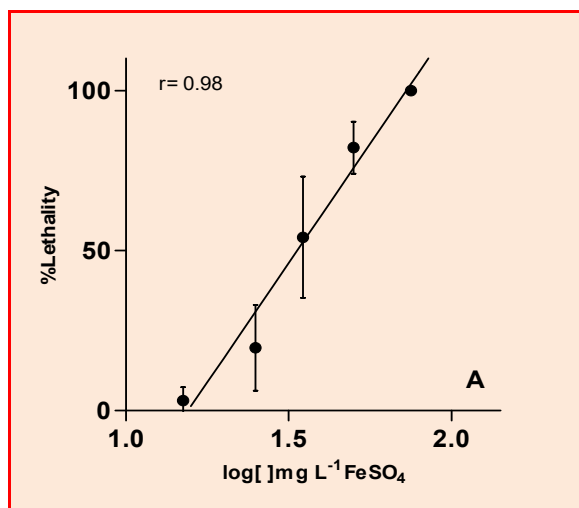


Gráfico 1. Curva Concentración-Respuesta del FeSO_4 a 24h de exposición sobre *Artemia franciscana* en pH 4.5

b) pH 5.5

La respuesta de la CL₅₀ obtenida a este pH (Tabla 7), con respecto al pH anterior hay una disminución relativamente baja por lo que se necesita de una concentración más baja para ejercer una letalidad en *Artemia*.

Tabla 7. Índices de toxicidad a 24h de exposición con sulfato ferroso a pH 5.5

Índices de toxicidad	Valores mg L ⁻¹ (L.C. 95%)
24H-NOEC	3.49 (0.64-7.09)
CL ₅₀ (24)	41.30 (32.66-56.49)

En el gráfico 2 se observa una curva concentración-respuesta a 24h del sulfato ferroso a un pH de 5.5, en el cual se obtiene una respuesta que al aumentar la concentración aumenta la letalidad.

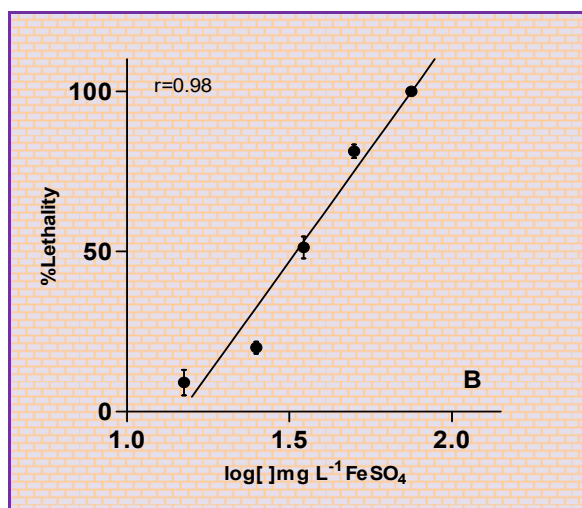


Gráfico 2. Curva Concentración-Respuesta del FeSO₄ a 24h de exposición sobre *Artemia franciscana* en pH 5.5

c) pH 6.5

La CL_{50} obtenida a pH 6.5 (Tabla 8) es un valor similar al obtenido en los bioensayos anteriores, evidenciando que a pH ácidos el sulfato ferroso presenta toxicidad para los nauplios de *Artemia*, habiendo estadísticamente diferencias muy significativas ($p < 0.0001$) con respecto al pH control (Tabla 8).

Tabla 8. Índices de toxicidad a 24h de exposición con sulfato ferroso a pH 6.5

Índices de toxicidad	Valores mg L^{-1} (L.C. 95%)
24H-NOEC	6.31 (0.54-12.44)
$CL_{50(24)}$	42.66 (30.62-74.30)

En el gráfico 3 se observa una curva concentración-respuesta a 24h del sulfato ferroso a un pH de 6.5, en el cual los datos obtenidos corresponden a una relación directa mostrando un incremento de letalidad en conjunto con el aumento de las concentraciones ensayadas.

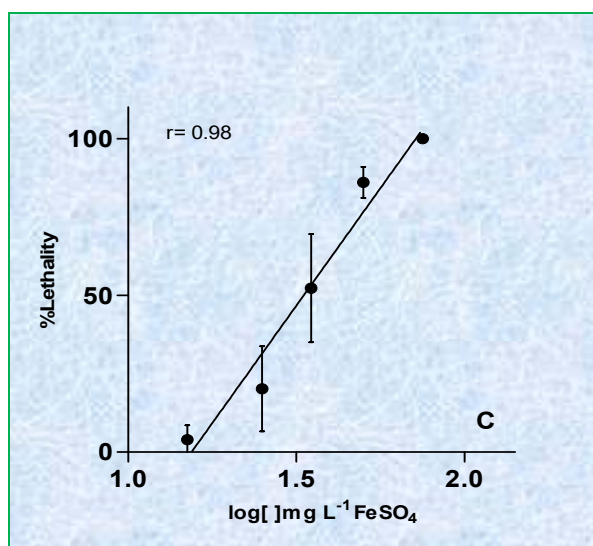


Gráfico 3. Curva Concentración-Respuesta del FeSO_4 a 24h de exposición sobre *Artemia franciscana* en pH 6.5

d) pH control 8.5

En la tabla 9 se observan los valores obtenidos de CL₅₀ y NOEC del pH control, el cual es poco toxico pues presenta valores por encima de 100 mg/L por lo tanto requiere de una mayor concentración con respecto a las variaciones de pH ensayadas.

Tabla 9. Índices de toxicidad obtenidos a pH control (8.5)

Índices de toxicidad	Valores mg L⁻¹ (L.C. 95%)
24H-NOEC	111.94 (0.225-157.40)
CL ₅₀ (24)	172.98 (23.71-217.27)

En el grafico 4 se puede observar la curva concentración-respuesta del FeSO₄ de forma sigmoidea mediante un análisis de regresión no lineal, que nos arroja un coeficiente de correlación *r* positivo, que indica que conforme aumenta la concentración del tóxico aumenta el porcentaje de letalidad.

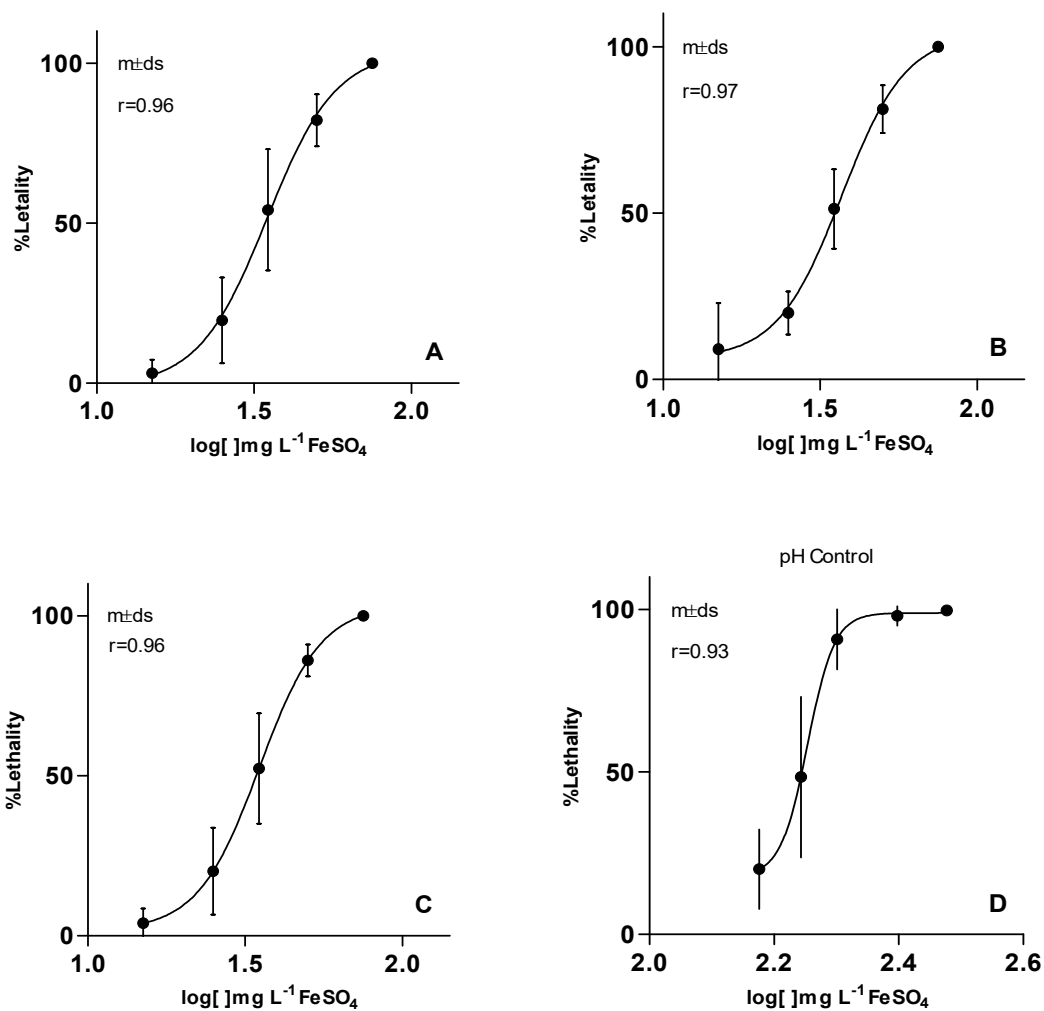


Gráfico 4. Curva Concentración-Respuesta del FeSO_4 sobre *Artemia franciscana*. A) pH 4.5; B) pH 5.5; C) pH 6.5; D) pH Control 8.5. Cada punto representa la media muestral de cada concentración con su respectiva desviación estándar ($m \pm ds$).

8.1 COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE CL_{50} A 24H CON RESPECTO A LAS VARIACIONES DE pH

Después de obtener las CL_{50} de cada pH (4.5 y 5.5 ligeramente ácidos) se realizó la comparación de este parámetro con respecto al pH control. Para establecer diferencias estadísticas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de

una vía; en la tabla 10 se muestran las diferencias estadísticamente significativas entre los pH bajos con respecto al pH control de acuerdo con las concentraciones ensayadas de FeSO₄ en el bioensayo:

Tabla 10. Resultados de ANOVA de la comparación de CL₅₀ del pH control con respecto a las variaciones de pH

[FeSO ₄] mg L ⁻¹	pH	P<0.05
15	5.5 vs. 8.5	0.005 (**)
25	4.5, 5.5 y 6.5 vs. 8.5	P<0.0001 (***)
35	4.5, 5.5 y 6.5 vs. 8.5	P<0.0001 (***)
50	4.5, 5.5 y 6.5 vs. 8.5	P<0.0001 (***)
75	4.5, 5.5 y 6.5 vs. 8.5	P<0.0001 (***)
150	4.5, 5.5 y 6.5 vs. 8.5	P<0.0001 (***)
175	4.5, 5.5 y 6.5 vs. 8.5	P<0.0001 (***)
200	4.5, 5.5 y 6.5 vs. 8.5	P<0.0001 (***)
250	4.5, 5.5 y 6.5 vs. 8.5	0.0025(**)
300	4.5, 5.5 y 6.5 vs. 8.5	0.2206 (ns)

(***) Diferencias estadísticamente muy significativas con un valor de **p** muy por debajo de 0.05 (p<0.0001). (**) Es significativo y cae a un valor de p<0.001. (ns) No significativo.

Como se observa en el gráfico 5, ante las variaciones de pH (4.5-6.5) el FeSO₄ es tóxico a corto plazo para los nauplios de *Artemia* (Categoría III de acuerdo con la EPA), mientras que al pH control (8.5) se necesita de una mayor concentración por encima de 100 mg/L por lo que se considera no tóxico (Categoría IV EPA). No obstante, al comparar la respuesta en los 3 tratamientos con respecto al control se encuentran diferencias estadísticas muy significativas (p<0.0001); esto mismo sucede entre las variaciones de pH, las concentraciones son muy similares entre los 3 para la 24h-NOEC y CL₅₀₍₂₄₎ de cada uno.

A los pH más bajos ensayados se necesita de menor concentración, ya que el Fe se encuentra en su forma libre, y a pH más elevado precipita formando $\text{Fe}(\text{OH})_2$. El ion ferroso (Fe^{+2}) se oxida a ion férrico (Fe^{+3}).

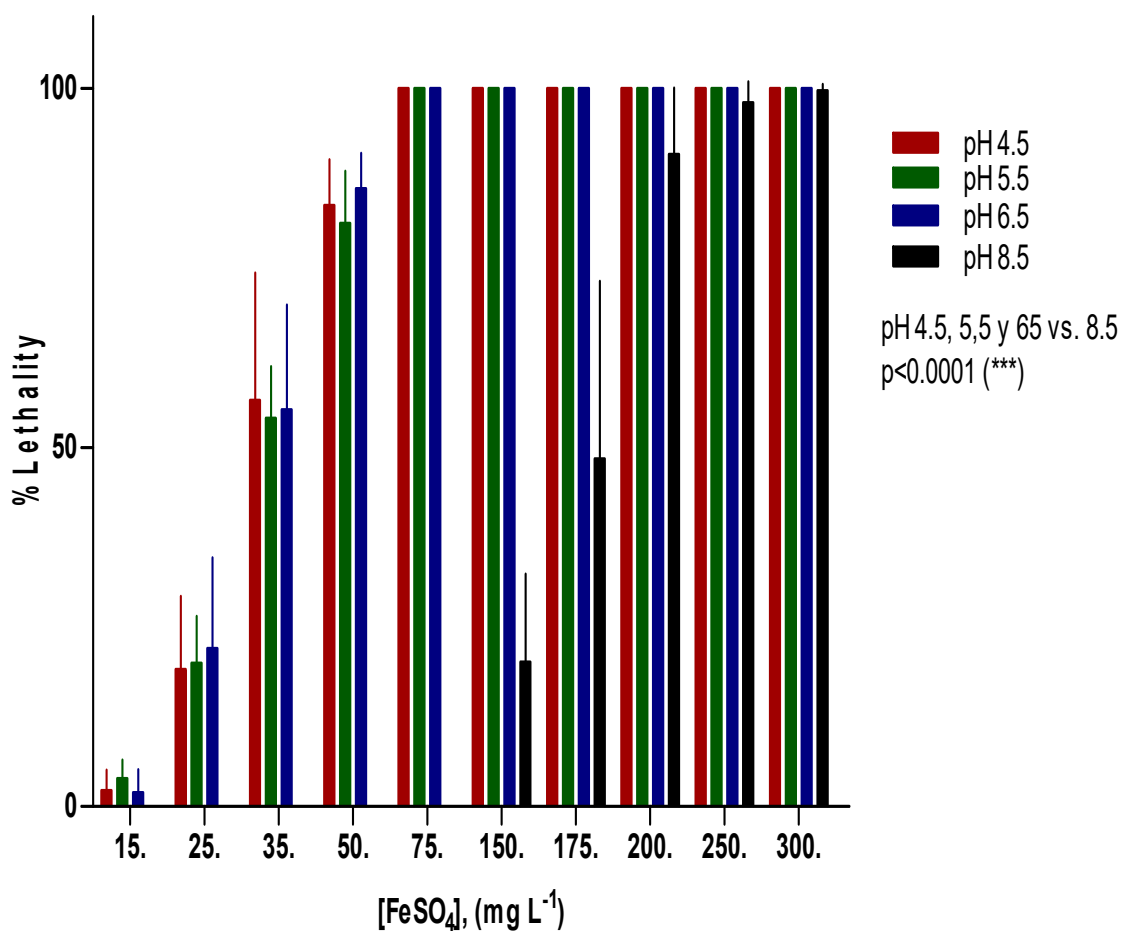


Gráfico 5. Comparación de las CL_{50} obtenidas a pH control con respecto a las variaciones de pH a 24h de exposición con FeSO_4 .

9. DISCUSIÓN

De acuerdo con la EPA (1986), las sustancias cuya toxicidad aguda observada es inferior a una parte por millón (1mg/L) se consideran generalmente muy tóxicas. Su manipulación, utilización o descarga en el medio entrañan un alto grado de peligro agudo y se clasifican en una Categoría I. Por encima de ese valor, se utiliza una potencia de diez para distinguir las diferentes categorías de toxicidad aguda. Las sustancias que presentan una toxicidad aguda de una a diez partes por millón (1-10mg/L) se clasifican en la Categoría II, de diez a cien partes por millón (10-100mg/L) en la Categoría III de toxicidad aguda y aquellas con más de cien partes por millón (>100mg/L) se consideran prácticamente no tóxicas en la Categoría IV. Acorde a los datos obtenidos de CL_{50} a 24h de exposición con el $FeSO_4$ sobre los nauplios de *Artemia*, en cuanto a una variación de pH (4.5, 5.5 y 6.5), se obtuvieron 43.25 mg/L, 41.30 mg/L y 42.66 mg/L respectivamente; por lo tanto, el $FeSO_4$ presenta un comportamiento tóxico agudo dentro de la categoría III. Mientras que a pH control (8.5) se obtuvo una CL_{50} de 172.98 mg/L, indicativa de mínima toxicidad.

Los primeros conocimientos sobre los efectos de los metales en los organismos acuáticos se inician a principios del siglo XX (Norwood et al., 2003). Éstos provienen de estudios experimentales basados en ensayos de toxicidad aguda y crónica, mediante los cuales se obtienen las concentraciones letales o efectivas para el 50% de la población analizada (CL_{50} ; CE_{50}) y las concentraciones de efecto mínimo y de efecto no observables (CEM; NOEC). A partir de estos valores las agencias internacionales suelen establecer los niveles guía para la protección de la biota (OECD, 1981; EPA, 1984; APHA, 1989).

Las larvas de *Artemia spp* se han utilizado por más de 40 años en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos (Vanhaecke y Persoone, 1984; Torokne et al., 2007) y se ha estudiado su biología y usos potenciales en diversos campos como

un método práctico y económico para la determinación de bioactividad de compuestos sintéticos y productos naturales (Meyer et al., 1982; McLaughlin, 1991; McLaughlin et al., 1998; Lhullier et al., 2006; Stefanello et al., 2006; Silva et al., 2007). En 1982, Meyer et al., fueron los primeros en introducir el uso de las larvas de *Artemia spp* en sustitución de animales superiores en la evaluación de extractos vegetales para el descubrimiento de compuestos con actividad antitumoral y citotóxica. Este ensayo se utiliza para la pre-evaluación de extractos vegetales en el descubrimiento de compuestos antitumorales (Silva et al., 2007).

Por tanto, es una excelente alternativa a los problemas que la bioética presenta ante la experimentación con los animales superiores. En relación con tomar una u otra especie, se ha podido observar que las especies de invertebrados como los crustáceos son más sensibles a sus efectos que los vertebrados como los peces (Botello et al., 2005). Debido a esta particularidad, hemos basado la elección de nuestro bioindicador. La diversidad sobre la respuesta obtenida en diferentes especies puede ser debida a que este metal ingresa en algunos organismos acuáticos por medio de distintos tipos de transporte (ej: difusión pasiva) (EPA, 1978).

Dávila y Rincón (2009), realizaron un estudio de toxicidad aguda de sulfato ferroso sobre el crustáceo *Daphnia magna* obteniendo una CL₅₀ de 1.84 mg/L, y comparan su resultado con otras investigaciones utilizando el mismo bioindicador a 48h de exposición, como se muestra en la tabla 11:

Tabla 11. Valores comparativos de la CL50 utilizando *Daphnia magna* expuesta al FeSO₄ (Dávila y Rincón, 2009).

CL ₅₀ (48)	REFERENCIA
6.52 mg/L	Cabejszek y Stasiak, E.U.A., 1960
5.20 mg/L	Dowden y Bennett, Canadá, 1965
9.61 mg/L	Biesinger y Christensen, Canadá, 1972
5.20 mg/L	Boulet y Chaisemartin, E.U.A., 1973
7.81 mg/L	Instituto Nacional del Agua y del Ambiente, Buenos Aires, Argentina, 2003
1.83 mg/L	Satizabal Corrales, Alexandra. Universidad del Valle, Colombia. 2007
1.84 mg/L	Dávila, D., Rincón, N. Universidad de la Salle, Colombia. 2009

Así en la Tabla 10, observamos que *Daphnia magna* es más sensible al compuesto metálico comparado con *Artemia franciscana* al ser dos organismos de ecosistemas acuáticos distintos y de igual forma el tiempo de exposición. Concordando que, la toxicidad para los diferentes grupos, especies y estadios no es la misma ya que varía de acuerdo con las condiciones ecológicas y a las características químicas del agua de sus respectivos hábitats y por supuesto el tiempo de exposición. Se debe tener en cuenta que la exposición continua a distintos contaminantes puede inducir respuestas de adaptación a la contaminación (Agra et al., 2010). Por lo tanto, es importante entender que si existe alta tolerancia mostrada por algunas especies puede ser el resultado de una exposición crónica permanente a la contaminación de sus respectivos hábitats (Reboleira et al., 2013).

Los primeros estudios realizados sobre el papel que ejerce la acidez en la toxicidad de los metales fueron realizados por Campbell (1985), el cual propuso que la acidificación de los diferentes cuerpos de aguas pueden ser en principio una influencia para interacciones de metal-organismo en al menos dos formas: la disminución en el pH puede afectar a la especiación de metal en solución, o puede afectar a la sensibilidad biológica en el nivel de la superficie celular, esto es mediante una interacción que le permita al metal atravesar la membrana celular y provocar una respuesta biológica. Para ello consideró estos posibles daños en un rango de pH 7-4. Sin embargo, sus estudios se centraron solamente en 10 metales (Ag, Al, Cd, Co, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn). Los resultados fueron pocos y no podían permitir generalizaciones, por ello el estudio en este campo ha precisado ampliar los resultados a más metales y bajo diferentes condiciones experimentales, incluyendo distintos organismos acuáticos (Brake et al., 1986).

El hierro y sus derivados aparecen involucrados en la acidificación de cuerpos de agua; actualmente se han reportado escasos estudios que evalúen el comportamiento de dicho metal ante este parámetro.

Entre los diversos estudios que manifiestan el grado de toxicidad que puede causar el hierro está el de Lukowiez et al., (1976), donde en estudios con la trucha arcoíris demuestran que los efectos tóxicos inducidos por el hierro vienen afectando la superficie intestinal y los huevecillos. Posteriormente Phippen et al., (2008) afirman que, a elevados niveles de pH aproximadamente por encima de un pH 5 el hierro es menos soluble, un posible mecanismo que aparece como consecuencia de esto es la precipitación de hidróxido férrico directamente en branquias. El hierro ha sido detectado en el epitelio de las branquias no dentro de ellas, indicando que la toxicidad aguda de este metal fue mediada por su acción en la superficie. En diferentes revisiones bibliográficas se determina que la toxicidad del hierro parece ser mayor en condiciones de acidez, lo cual coincide con nuestros resultados, en estos casos el hierro ferroso predomina, pero debiendo contemplar que el daño a ecosistemas acuáticos depende también de las cualidades del agua (Gerhardt, 1992). En el trabajo realizado por Solomon (2008), estudiando el daño provocado por las variaciones de acidez en el medio y

diferentes concentraciones de Cr (VI) sobre poblaciones fitoplanctónicas de la microalga eucariota *Dictyosphaerium chlorelloides*, cosmopolita de agua continental, se observó a concentraciones de 0.025mg/L, en un rango de pH (3-7.5), que los resultados obtenidos para los valores de la concentración inhibitoria $CL_{50(72)}$ a pH 7.5 y 4.25 dieron variaciones estadísticamente significativas entre ambos valores de pH. Sugiriendo que a pH ácido en presencia de cromo se afectaba más el crecimiento de las algas. Lo cual en comparación con nuestro estudio coincide en afirmar la mayor toxicidad a pH bajos, aunque en este caso sí con otro metal como es el Fe y un bioindicador zooplanctónico como es *Artemia*

En estudios con sales de hierro, Randall et al. (1999) reportaron con cloruro férrico en *Daphnia* efectos a una concentración de 4.5mg/L, bastante inferior a la alcanzada en nuestro estudio con el sulfato ferroso. Martin y Holdich (1986), en su trabajo toman como bioindicador *Crangonyx pseudogracilis*, con Fe^{3+} , y la CL_{50} que obtuvieron fue de 120 mg/L. Estos mismos autores determinaron sobre *Asellus aquaticus* una CL_{50} de 124mg/L, siendo los valores obtenidos en este caso superiores.

Los datos en la literatura muestran que la sensibilidad de las especies depende de no sólo de los bioindicadores, si no de los metales contaminantes a los que están expuestos y las características fisicoquímicas del agua, como también hemos comentado anteriormente. Por ejemplo, la toxicidad aguda (CL_{50-24h}) de cobre sobre *Daphnia magna* y *D. pulex* está considerada en el intervalo de 1.0 a 5.2 $\mu g/L$ (Gaete y Chávez, 2008), en tanto que He et al., (2005) reporta 4 $\mu g/L$ y 12 $\mu g/L$ para agua suave y agua dura, respectivamente. Kokkali et al., (2011) reporta un valor de CL_{50} 19.5 mg/L en *A. salina*. Lo anterior sugiere que las diferencias mostradas entre los valores de CL_{50} en cada uno de los casos se deben tanto al bioindicador como a las características fisicoquímicas del agua. Existe poca evidencia sobre la toxicidad de este metal debido a su requerimiento como micronutriente a dosis traza, además las sales de hierro ($Fe[III]$) tienen una moderada toxicidad aguda debido a su rápida oxidación a formas insolubles ($FeOH_3$) y pueden ser fácilmente precipitadas (Anholt et al., 2002).

Lo que sí ha quedado demostrado es que el impacto del medio ambiente es relevante para comprender el grado de diferenciación morfológica en poblaciones de *Artemia*. La habilidad de *Artemia* para cambiar su apariencia bajo la influencia de la salinidad se estableció en trabajos anteriores por Amat et al. (1991), Rodríguez-Almaraz et al. (2006) y Ben Naceur et al. (2011b) mostrando que una mayor salinidad conduce a un adulto reducido tamaño corporal.

En la revisión bibliográfica realizada se ha comprobado que es muy difícil establecer comparaciones del sulfato ferroso con otros estudios que utilicen el mismo bioindicador ya que las investigaciones previas son limitadas, lo cual llama la atención dado que es un compuesto ampliamente utilizado en tratamientos de aguas.

10. CONCLUSIONES

La toxicidad del sulfato ferroso a los valores de pH (4.5 y 5.5) sobre *Artemia franciscana* muestra mayor sensibilidad, comportándose como más tóxico en comparación al pH control de 8.5.

Ciertas particularidades comunes de los anostracas tales como el tamaño, la morfología, ciclo biológico y el rol ecológico, los resalta como buenos indicadores de toxicidad y permiten evaluar eficientemente los efectos y mecanismos de acción de los metales; el ensayo de toxicidad empleando como bioindicador *Artemia franciscana* resultó un método rápido, económico y confiable

El sulfato ferroso se comporta como una sustancia peligrosa para el ambiente acuático al incluirse dentro de la categoría III (10-100mg/L) para la toxicidad aguda establecida por la EPA a los diferentes valores de pH ensayados con respecto al control. De igual forma, a pesar de ser un compuesto con categoría III, este metal a exposiciones continuas y a diferentes fluctuaciones ambientales como es el pH presenta la capacidad de generar diferentes formas químicas que influyen en la toxicidad del mismo.

La vida en ecosistemas acuáticos puede decaer y fallar cuando se expone a extremos valores del pH, al igual que a los cambios rápidos en los niveles, incluso si el cambio ocurre dentro de un rango que suele ser tolerado por el ecosistema.

11. RECOMENDACIONES

La contaminación que se da en el medio ambiente acuático nos lleva a realizar permanentes evaluaciones ecotoxicológicas. Los bioensayos son herramientas ampliamente utilizadas en el campo de la Ecotoxicología.

Es importante seguir llevando a cabo pruebas de toxicidad con organismos de ambiente acuático, utilizando otras sustancias de interés, analizando en otros niveles de la cadena trófica, para obtener la mayor cantidad de datos asociados con los ecosistemas acuáticos.

Llevar a cabo pruebas de toxicidad crónica con el producto ensayado (FeSO_4).

Es necesario establecer criterios sólidos de calidad acuática a nivel nacional a través de herramientas que modifiquen y mejoren la normativa mexicana en relación a la calidad de las aguas, promoviendo e incentivando proyectos ambientales que consideren el desarrollo de estudios de evaluación y monitoreo de calidad de agua empleando indicadores biológicos, con el objeto de generar información sobre los diferentes impactos ambientales y así dar la posibilidad de crear mecanismos de acción orientados a la protección de los ecosistemas acuáticos.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ærtebjerg, G., Andersen, J.H., Hansen, O.S. (2003) Nutrients and Eutrophication in Danish Marine Waters. A challenge for Science and Management. Edit. Schultz Grafisk. 126 pp.
- Agra, A., Guilhermino, L., Soares, A., Barata, C. 2010. Genetic costs of tolerance to metals in *Daphnia longispina* populations historically exposed to a copper mine drainage. *Environmental Toxicology*, 29(1), pp. 939-946.
- Aguayo S., Muñoz MJ., de la Torre A., Roset J., de la Peña E. 2004. Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. *Science of Total Environmental* 328, 69-81.
- Alayo, M., Iannacone, J. 2002. Ensayos ecotoxicológicos con petróleo crudo, diesel 2 y diesel 6 con dos subespecies de *Brachionus plicatilis* Müller 1786 (Rotifera: Monogononta). *Gayana* 66: 45-58.
- Albek, M.L., Yetis, U., Gökçay, C.F. (1997) Effects of Ni (II) on respirometric oxygen uptake. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 636-641.
- Alvarado, N.E., Quesada, I., Hylland, K., Marigómez, I., Soto, M. (2006). Quantitative changes in metallothionein expression in target cell-types in the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. *Aquatic toxicology*, 77(1), 64-77.
- Alvarado, N.E. (2013). Contaminación por metales pesados: Monitoreo. Instituto Especializado de Análisis. Universidad de Panamá. Disponible en: <https://es.slideshare.net/milanyis/contaminacion-por-metales>

- Amat F, F Hontoria, JC Navarro, EA Gonzalbo, VI Varo. 1991. Bioecología de *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) en la Laguna de La Mata, Torre Vieja, Alicante. Torre de la Sal (CSIC), Spain: Instituto de Acuicultura.
- Amat F, F Hontoria, O Ruiz, AJ Green, MI Sanchez, J Figuerola, F Hortas. 2005. The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean. *Biol. Invasions* 7: 37-47.
- Amons, R., Clegg, J., Liang, P., Macrae, T. (1997). Molecular characterization of a small heat shock/alpha-crystallin protein in encysted *Artemia* embryos. *J Biol Chem.* 272:19051-19058.
- Andriolli, A., Beraldo, H., Santos, D., Teixeira, S., Teixeira, L., Ziolli, R. (2007), Avaliação do potencial citotóxico de 2-piridiniformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe (III) utilizando *Artemia franciscana*. *Heal. and Environ. J.* 8: 2-10
- Anholt, R.D. van, Spanings, F. a. T., Knol, A.H., Velden, J.A. van der, Bonga, S.E.W., 2002. Effects of Iron Sulfate Dosage on the Water Flea (*Daphnia magna* Straus) and Early Development of Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 182–192. doi:10.1007/s00244-001-0001-X
- Aparici, C.M. (2006). Introducción a la Imagen Molecular. *Revista Española de Medicina Nuclear*, 25(6), 394-409.
- APHA. 1989. Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th ed., Washington, DC, Part 8000.
- Arenas, J. (1993). Macroinvertebrados bentónicos como biondicadores de la calidad del agua del río Bío Bío, Chile. Tesis de Doctorado de la Facultad de Ciencias, Universidad de Concepción. 111pp.

- Armijo, F., Vázquez, I., Corvillo, I., Tenas., D., Capdevila, M., Maraver, F. Contenido en Fe, Cu y Zn en las aguas mineromedicinales españolas. *Bol Soc Esp Hidrol Med*, 2015; 30(1): 89-98.
- Asem, A., Rastegar-Pouyani, N., De Los Ríos-Escalante, P. (2010). The genus *Artemia* leach, 1819 (Crustacea: Branchiopoda). I. True and false taxonomical descriptions. *Submission article platform-Latin American Journal of Aquatic Research*, 38(3).
- Barnabe, G. (1991) *Acuicultura*. Ed. Omega. Tomos I y II: 1,099 p.
- Bartell, S.M., Gardner, R.H., O'Neill, R.V., 1992, *Ecological Risk Estimation*, Lewis Publishers, Boca Raton.
- Baruah, N.K., Kotoky, P., Bhattacharyya, K.G., Borah, G.C. (1996) Metal speciation in Jhanji River sediments. *The Science of the Total Environment*. 193, 1-12.
- Beg, M.U., Al-Muzaini, S., Saeed, T., Jacob, P.G., Beg, K.R., Al-Bahloul, M., Al-Matrouk, K., Al-Obaid, T., Kurian, A. (2001) Chemical contamination and toxicity of sediment from a coastal area receiving industrial effluents in Kuwait. *Arch. Env. Contam. Toxicol.* 41(3): 289-297
- Benjamín, M., Leckie, J. 1995. Multiple site adsorption of Cd, Cu, Zn and Pb on amorphous iron oxyhydroxide. En: Maya, P. y Hansen, A.M. Competencia de iones mayores en la migración química de cadmio y plomo en sedimentos del Lago de Chapala, México. *Ingeniería Hidráulica en México*. Enero-abril. Vol. X, núm. 1, pp. 35-36.
- Ben Naceur H, A Ben Rejeb Jenhani, MS Romdhane. 2011b. Influence of some environmental factors on *Artemia salina* life cycle and morphology in Sabkhet El Adhibet (southeast Tunisia). *Biological Lett.* 48: 67-83.
- Bilos, C., Colombo, J.C., Rodríguez, M.J. (1998) Trace metals in suspended particles, sediments and Asiatic clams of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environmental Pollution*. 99, 1-11.

- Bilotta, G.S., Brazier, R.E., Haygarth, P.M., Macleod, C.J., Butler, P., Granger, S., Krueger, T., Freer, J., Quinton, J. (2008). Rethinking the contribution of drained and undrained grasslands to sediment-related water quality problems. *Journal of Environmental Quality*, 37(3), 906-914.
- Blanco, J. (2009) Degradación de un efluente real textil mediante procesos Fenton y Foto-Fenton. Tesis de master no publicada, Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona, España.
- Boccio, J., Salgueiro, J., Lysionek, A., Zubillaga, M., Goldman, C., Weill, R., Caro, R. (2003). Metabolismo del hierro: conceptos actuales sobre un micronutriente esencial. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 53(2), 119-132.
- Bodek, I.B., Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1988). Environmental inorganic chemistry: Properties, processes, and estimation methods. SETAC Spec. Publ. Ser. New York: Pergamon Press.
- Botello, V. A., Rendón, V. O. J., Gold-Bouchot, G., Agraz, H. C. 2005. Golfo de México: Contaminación e Impacto Ambiental. Diagnóstico y Tendencias. 2° ed. Coatzacoalcos (Veracruz): Universidad Autónoma de Campeche.
- Bouju, M. (2003) Relation between extracellular polymers composition and ability to complex Cd, Cu and Pb.
- Brake, D. F., Cusimano, R. F., Chapman, A. 1986. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to trout. *Journal Fish Aquatic Science*, 1(1), pp. 113- 118.
- Brito, R., Gelabert, R., Jimenez, J. (2006), Efectos tóxicos del Níquel y el Zinc en *Artemia franciscana* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca). *Universidad y ciencia*, Vol. 22. 001: 65-74
- Campbell, P. G. (1985). Acid deposition: Effects on geochemical cycling and biological availability of trace elements. National Academies.

- Canli, M., Kalay, M., Ay, O. (2001) Metal (Cd, Pb, Cu, Zn, Fe, Cr, Ni) concentrations in tissues of a fish *Sardina pilchardus* and a prawn *Peaenus japonicus* from three stations on the Mediterranean Sea Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67: 75-82.
- Capó-Martí, M.A. (2007). *Principios de Ecotoxicología*. Diagnóstico, Tratamiento y Gestión del Medio Ambiente. Editorial Tébar. 320 p.
- Carballo-Hondal, O., Arencibia-Carballo, G., Concepción, J., Isla-Molleda, M. (2003). Los bioensayos de toxicidad en sedimentos marinos. *Revista de Toxicología en Línea*. La Habana, Cuba. 33-69
- Castillo-Morales, G. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IMTA. México. 189 p.
- Castro del Pozo, S. Metabolismo del hierro normal y patológico. Segunda edición. Masson. Barcelona, España. 1995.
- Centeno, M., Persoone, G., Goyvaerts, M. 1995. Cyst-based toxicity test. IX. The potential of *thamnocephalus platyurus* as test species in comparison with *Streptocephalus proboscideus* Crustacea: Branchiopoda: Anostraca). *Environmental Toxicology and Water Quality* 10: 275-282.
- Chapman, P.M. 1989. Review: current approaches to developing sediment qualityncriteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 589-599.
- Chapman, P.M. (2000). Whole effluent toxicity testing-usefulness, level of prediction, and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 3-13.
- Chapman, P.M. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, 2002; 44(1): 7-15.
- Chapman, P.M. 2007. Determing when contamination is pollution – Weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environmental International*. 33: 492-501.

- Clegg, J.S., Conte, F.P. (1980). A review of the cellular and developmental biology of *Artemia*: 11–54. In: The brine shrimp *Artemia*. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds). Vol. 2. Universa Press, Wetteren, Belgium, 664 pp.
- CMA (Colorado Mining Association). 2010. Ambient water quality standards for iron. Review and Update. Prepared by R² Incorporated. Pp 16.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2007. Manual de agua potable alcantarillado y saneamiento, diseño de plantas potabilizadoras tipo de tecnología simplificada. Pp. 320:42
- Compendio de Cuatro Reglamentos. 1999. Ministerio de Salud y Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS), Costa Rica.
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). 2008. Estadísticas del agua en México. Disponible en: <http://www.aneas.com.mx/documentos.html> [Consulta: 30-Julio-2008].
- Curto, E.D. (2006). Artemia, el camaron de la sal. Banados del rio Dulce y laguna Mar Chiquita (Córdoba, Argentina), Academia Nacional de Ciencias, Córdoba, Argentina, 161-171.
- Dávila, D.C., Rincón, N. (2009). Diseño de un sistema a nivel piloto para la remoción del hierro y el manganeso por debajo de la Concentración Letal Media (CL₅₀₋₄₈) para *Daphnia magna*. (Tesis de grado). Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia.
- Day, K.E., Ongley, E.D., Scroggins, R.P., Eisenhauer, R.P., 1988, "Biology in the New Regulatory Framework for Aquatic Protection", Proceedings for the Alliston Workshop, National Water Research Institute (Burlington, Ontario) and Environment Canada (Ottawa).
- De Schamphelaere, K.A.C., Stauber, J.L., Wilde, K.L., Markich, S.J., Brown, P.L., Franklin, N.M., Creighton, N.M., Janssen, C.R. (2005). Toward a biotic ligand

- model for freshwater green algae: Surface-bound and internal copper are better predictors of toxicity than free Cu^{2+} ion activity when pH is varied. *Environ Sci. Tech.* 39: 2067-2072.
- Depledge, M.H., Fossi, M.C. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology*. 3:161-172.
- Dockery, M., Tomkins, S. (2000). Brine shrimp ecology. *British Ecological Society*.
- Dorn, P.B., Rodgers, J.H., Kop, K.M., Raia, J.C., Dickson, K.L. (1987). Hexavalent chromium as a reference toxicant in effluent toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 435-444.
- Dutka, B.J., 1996, Bioassays: a Historical Summary of those Used and Developed in our Laboratories at NWRI. National Water Research Institute, Environment Canada, Burlington. 93 pp.
- EPA. 1984. Estimating concern levels for concentrations of chemical substances in the environment. Environmental effects Branch, Environmental Protection Agency, Washington DC, USA.
- Environmental Protection Agency. (1986). Guidelines for the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures. EPA/630/R-98/002; Risk Assessment Forum; Washington, D.C.
- Environmental Protection Agency. (1986). Guidelines for the health risks, Assessment of chemical mixtures. Federal register. 51 (185), 34014-34025.
- Environmental Protection Agency. (2002a) Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, 5th edition. EPA 821/R-02/012. Washington DC. 275 p.
- Environmental Protection Agency. (2002b) Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms, 4th edition. EPA 821/R-02-13. Washington DC. 350 p.

- Environmental Protection Agency. (2002c) Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms, 3rd edition. EPA 821/R-02-14. Washington DC. 486 p.
- Environmental Protection Agency. (2004) National Whole Effluent Toxicity (WET) Implementation Guidance Under the NPDES Program. EPA 832-B-04-003. Washington D.C. 109 p.
- Escribano, R., Castro, L. (2013) Capítulo 14 Plancton y productividad. *Biología Marina y Oceanografía: Conceptos y Procesos*. 289-312 p.
- Espigares-García, M., Pérez-López, J. A. (1985). Aspectos sanitarios del estudio de las aguas. *Universidad de Granada. Servicio de Publicaciones. Granada*.
- Faustman, E.M., Omenn, G.S., 1996, "Risk Assessment", en: Casarett and Doull's Toxicology, C.D. Klaassen editor, Chapter 4, McGraw-Hill, international edition.
- Forstner, U. (1995). Land contamination by metals: Global scope and magnitude of the problem. In: Allen, H. et al., eds. Metal speciation and contamination of soil. Boca Raton, FL: Lewis Publishers.
- Gaete, H., Chávez, C. 2008. Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (Cladóceras, Crustacea). *Asociación Ibérica de Limnología*. 27(1): 1-10.
- Gambhir, S.S. (2006). Using radiolabeled DNA as an imaging agent to recognize protein targets. *Journal of Nuclear Medicine*, 47(4), 557-558.
- Gamboa, M., Reyes, R., Arrivillaga, J. (2008). Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de salud ambiental. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 48(2), 109-120.
- García-Casallas, J.C. (2011). Toxicidad por metales pesados. *Medicina Interna. Farmacología Clínica*. Disponible en: <https://es.slideshare.net/garciaj.cesar/toxicidad-por-metales-pesados>

- Gerhardt, A. 1992. Effects of subacute doses of iron (Fe) on *Leptophlebia marginata* (Insecta: Ephemeroptera. Freshw. Biol. 27: 79-84.
- Gil, F., Pla, A. 2001. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. Journal of Applied Toxicology. 21:245-255.
- Goodman, L.S., Gilman, A. The pharmacological basis of therapeutics. Pergamon Press Inc. New York, USA. 1996.
- Henretig, F. M. (1998). Lead poisoning. *Goldfrank's toxicologic emergencies (6th ed.)*. Norwalk, CT: Appleton & Lange.
- Hobbs, D.A., Warne, M.St.J., Markich, S.J. (2005) Evaluation of criteria used to assess the quality of aquatic toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 1, 174-180.
- Iannacone, J., Alvarino, L., Dale, W. 1998. Pruebas ecotoxicológicas como una herramienta para la evaluación del impacto ambiental de los ecosistemas acuáticos. Boletín de Lima 113: 53-68.
- Iannacone, J.A., Dale, W.E. 1999. Protocolo de bioensayo ecotoxicológico para evaluar metales pesados contaminantes de agua Dulce con *Chironomus calligraphus* (Díptera: Chironomidae y *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera), en el Río Rímac, Lima, Perú. Rev. Per. Ent. 41:111-120.
- Ingersoll, C.G. 1995. Sediment toxicity test. In: Rand GM, editor. Fundamentals of aquatic toxicology. 2nd Ed. Washington DC: Taylor y Francis. 231-255 p.
- Instituto Nacional de Ecología. 2007. Programa de Monitoreo y Evaluación de Sustancias Tóxicas, Persistentes y Bioacumulables (PRONAME). http://siscop.ine.gob.mx/descargas/proname_vdic.pdf.
- Jiménez, J. G., Gelaber, R., Brito, R. (2006). Efectos tóxicos del níquel y el zinc en *Artemia franciscana* (crustacea: branchiopoda: anostraca). *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 22(1).

- Kelderman, P., Kruis, G.F. 2001. Laboratory Course Aquatic Chemistry and its Applications in Environmental Engineering. International Institute for Infrastructural, Hydraulic and Environmental Engineering, Holanda.
- Kokkali, V., Katramados, I., Newman, J. D. (2011). Monitoring the effect of metal ions on the mobility of *Artemia salina* nauplii. *Biosensors*, 1(2), 36-45.
- La diversidad de los ecosistemas. La vida en el mar. Consultado en: <http://assets.mheducation.es/bcv/guide/capitulo/8448181697.pdf>
- Langmuir, D., Chrostowski, P., Vigneault, B., Chaney, R. (2004). Issue paper on the environmental chemistry of metals. In *US-EPA Risk Assessment Forum: Papers Addressing Scientific Issues in the Risk Assessment of Metals*.
- Langmuir, D., Chrostowski, P., Vigneault, B., Chaney, R. (2005) Issue paper on the environmental chemistry of metals. U.S. EPA. Washington, DC. 106 p.
- Lauth, J., Dyer, S., Belanger, S., Cherry, D. 1995. A novel flow-through method for toxicity assessments using *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Water Quality* 11: 335-343.
- Leckie, J.O. 1995. Adsorption and transformation of trace metals element species at sediment/water interface. En: Maya, P. y Hansen, A.M. Competencia de iones mayores en la migración química de cadmio y plomo en sedimentos del Lago de Chapala, México. *Ingeniería Hidráulica en México*. Enero-abril. Vol. X, núm. 1, pp. 35-40.
- Liang, P., MacRae, T. H. (1999). The Synthesis of a Small Heat Shock/ α -Crystallin Protein in *Artemia* and Its Relationship to Stress Tolerance during Development. *Developmental biology*, 207(2), 445-456.
- Lhullier, C., Horta, P.A., Falkenberg, M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Braz J Pharmacogn*. 2006; 16:158-163.

- Mac-Quhae, C.A., Romero, C., Morales, D.A. (2007). Toxicidad aguda del hidróxido de sodio sobre *Moina macrocopa* (Crustácea, Branchiopoda). *Ecotropicos*, 20(1), 24-30.
- Maki, A.W. (1983). Ecotoxicology –Critical needs and credibility. *Environ. Toxicol. Chem.* 2, 259-260.
- Mancera, R.N.J., Álvarez, L.R. (2006). Current State of Knowledge of the Concentration of Mercury and other Heavy Metals in Fresh Water Fish in Colombia. *Scielo*. 27 Enero, 11(1), pp. 4-5.
- Marín-Leal, J.C. (2013). Metales en ambientes acuáticos. *Ecotoxicología Acuática*. Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
- Martin, T.R., Holdich, D.M. (1986). The acute lethal toxicity of heavy metals to peracarid crustaceans (with particular reference to fresh-water asellids and gammarids). *Water Research*, 20(9), 1137-1147.
- Martin, J.W., Davis, G.E. (2001). An Updated Classification of the Recent Crustacea. *Science Series*. USA. 39: 124 p.
- Martín, N. (2015) *Artemia salina* (Parte III). Planeta Neli. *Acuariofilia y fotografía, dos mundos apasionantes*. Disponible en: <http://www.planeta-neli.es/index.php/2015/10/28/artemia-salina-parte-iii/>
- Martínez, A.P., Romieu, I. (1997). Introducción al monitoreo atmosférico. Metepec:ECO
- Martínez-Jerónimo, F., Rodríguez-Estrada, J., Martínez-Jerónimo, L. (2008). *Daphnia exilis* Herrick, 1895 (Crustacea: Cladocera): Una especie zooplanctónica potencialmente utilizable como organismo de prueba en bioensayos de toxicidad aguda en ambientes tropicales y subtropicales. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 24(4), 153-159.

- McLaughlin, J.L. Bench-top bioassays for the discovery of bioactive compounds in higher plants. *Brenesia*. 1991; 34:1-14.
- McLaughlin, J.L., Lingling, L.R., Anderson, J.E. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information J*. 1998; 32: 513-524.
- Mendoza-Cantú, A., Ramírez-Romero, P., Cuesta-Zarco, I.J., Salazar-Coria, L., Sobrino-Figueroa, A.S., Pica-Granados, Y. 2011. *Daphnia magna* (Strauss, 1820) y *Pseudokirshneriella subcapitata* (Hindak, 1990) como herramientas bioanalíticas para la evaluación ecotoxicológica en países en desarrollo. *Hidrobiológica*. En revisión.
- Menéndez, A.N. (2010) Transporte de contaminantes en el medio acuático. Universidad Tecnológica Nacional. Maestría en Ingeniería Ambiental. 123 p.
- Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putman J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., McLaughlin J.L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*. 45: 31-34.
- Meyer, J.S., Santore, R.C., Bobbit, J.P., Debrey, L.D., Boese, C.J., Paquin, P.R., Allen, H.E., Bergmann, H.L., Di Toro, D. (1999). Binding of nickel and copper to fish gills predictstoxicity when water hardness varies, but free ion activity does not. *Environ. Sci. Technol*. 33: 913-916.
- Mladenka P. Hrdina R. Hubl M, Simunek T. 2005. The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. Charles university in Prague, Faculty of Farmacy. Departament of Pharmacology, Hradec Králové, Czech Republic.48(3-4):127-135.
- Moriarty, F. 1988. *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems*. 2ª ed. Academic Press, Gran Bretaña. 289 pp.
- Norwood, W.P., Borgmann, U., Dixon, D.G., Wallace, A. 2003. Effects of metal mixtures on aquatic biota: a review of observations and methods. *Humann and Ecol. Risk Assess*. 9(4): 795-811.

- OECD. 1981. Test Guideline 452. Chronic Toxicity Studies. In: OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation & Development, Paris.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2003. Iron drinking water. Documento de referencia para la elaboración de las guías OMS para la calidad del agua potable Ginebra (Suiza). (WHO/SDE/WSH/0304/8).
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). 2002. Operación de mantenimiento de plantas de tratamiento de aguas. Manual de capacitación. Lima, Perú. Publicación financiada por la EPA. Pp 494-495.
- Orozco, C., Pérez, A., González, M.N., Rodríguez, F.J., Alfayate, J.M. (2003) Contaminación Ambiental: Una visión desde la Química. Ed. Paraninfo. España. 682 p.
- Ortiz Gómez, Sandra. (2009). *Escenarios de la distribución de cadmio en agua y sedimento en la presa Arcediano*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Morelos, México.
- Pacheco Gómez, J. D. (2011). Determinación de la toxicidad aguda (CL50) del extracto de Polvillo de carbón frente a larvas de *Artemia franciscana* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Páez-Osuna, F. (1996^a) Efectos de los metales. En: Vázquez-Botello A, Rojas-Galaviz JL, Benítez JA, Zárate-Lomelí D. (eds) Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica; (5): 666 pp.
- Páez-Osuna, F. (1996^b) Fuentes de metales en la zona costera marina. En: Vázquez-Botello A, Rojas-Galaviz JL, Benítez JA, Zárate-Lomelí D (eds) Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica; (5): 666 pp.

- Páez-Osuna, F. (2005) Efectos de los metales. Pp. 343-360. En: Botello, A.V., Rendón-von Osten, J., Gold-Bouchot, G., Agraz-Hernández, C. (Eds.) Golfo de México. Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. 2^{da} ed. Univ. Autón. de Campeche. Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p.
- Papadopoulos, A.I., Lazaridou, E., Mauridou, G., Touraki, M. (2004) Glutathione S-transferase in the branchiopod *Artemia salina*. Mar. Biol. 144: 259-301.
- Paquin, P.R., Gorsuch, J.W., Apte, S., Batley, G.E., Bowles, K.C., Campbell, P.G.C., Delos, C.G., Di Toro, D.M., Dwyer, R.I., Galvez, F., Gensemer, R.W., Goss, G.G., Hogstrand, C., Janssen, C.R., McGeer, J.C., Naddy, R.B., Playle, R.C., Santore, R.C., Scheneider, U., Stubblefield, W.A., Wood, C.M., Wu, K.B. (2002). The biotic ligand model: A historical overview. Comp. Biochem. Physiol. C: Comp, Pharmacol. 133: 3-36.
- Persoone, G., Van de Vel, A., Van Steertegem, M., De Nayer, B. (1989). Predictive value of laboratory tests with aquatic invertebrates: influence of experimental conditions. *Aquatic Toxicology*, 14(2), 149-167.
- Peuranen, S., Vuorinen, J.P., Vuorinen, M., Arto H.1994.The effects of iron, humic acids and low pH on the gills and physiology of Brown Trout (*Salmo Trutta*). Helsinki Finland. Finnish Game and Fisheries Research Institute.31:389-396.
- Phippen, B., Hovarth, C., Nordin, R., Nagpal, N. 2008. Ambient water quality guidelines for iron. Ministry of Enviroment Province of British Columbia. Science and Information Branch Water Stewarship Division Ministry of Enviroment.
- Pino-Pérez, O., Jorge-Lazo, F. (2010). Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de protección vegetal*, 25(1), 34-43.
- Ponce-Vélez G, Vázquez-Botello A. (1991) Aspectos geoquímicos y de contaminación por metales pesados en la Laguna de Términos, Campeche. *Hidrobiológica* 1(2): 1-10.

- Prosi, F. (1981) Heavy metals in aquatic organisms. In: Metal Pollution in the Aquatic Environment Cap. F, Förstner and Wittmann (Eds) *Springer-Verlag*, Berlín. 271-323.
- Ramírez-Romero, P., Mendoza-Cantú, A. 2007. Ensayos Toxicológicos para la Evaluación de Sustancias Químicas, Aguas, Sedimentos y Suelos. La Experiencia en México. SEMARNAT-INE. México. 414 p.
- Ramírez-Romero, P., Mendoza-Cantú, A. (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. SEMARNAT-INE. Edit. IEPSA. México. 428 p.
- Ramírez-Romero, P., Guzmán-Martínez, Ma. del C., Barrera-Escorcia, G., García, X.G. (2012). La Ecotoxicología, herramienta para la conservación y la óptima producción de organismos acuáticos. *Acuicultura en México: Impacto en Producción, Manejo y Conservación. Editorial Académica Española*.
- Ramos, J.P., Camacho, L.A. 2004. Análisis del impacto del vertimiento del hierro resultante de un proceso de tratamiento primario de aguas residuales domésticas descargadas al río Bogotá (Colombia). Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. Congreso Latinoamericano de hidráulica Sao Pedro, estado de Sao Paulo, Brasil. 2004. Pp 9.
- Rand, G.M. (1995). Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. CRC press.
- Reboleira, A.S., Abrantes, N., Oromí, P., Gonçalves, P. 2013. Acute Toxicity of Copper Sulfate and Potassium Dichromate on Stygobiont *Proasellus*: General Aspects of Groundwater Ecotoxicology and Future Perspectives. *Water Air Soil Pollut.* 1(1): 224-1550.
- Reish, D.L., Oshida, P.S. 1985. *Manual of methods in aquatic environment research. Part 10 - Short-term static bioassays*. FAO Fish. Tech. Paper 247: 62 pp.

- Repetto, G., Repetto, M. (2010) Toxicología fundamental. 4ª ed. Ediciones Díaz de Santos. 619 p.
- Rivero, F. (2015) Reproducción sexual partenogenética (del gr. “parthenos”, virgen). Instituto Español de Lisboa.
- Rodríguez-Almaraz GA, C Zavala, R Mendoza, AM MaedaMartínez. 2006. Ecological and biological notes on the brine shrimp *Artemia* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca) from Carmen Island, Baja California Sur, Zoological Studies 51(4): 453-462 (2012) 461 México. Hydrobiologia 560: 417-423
- Rodríguez, J., Esclapés, M. 1995. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas (PDVSA-INTEVEP). Versión 1.0. Gerencia General de Tecnología. Departamento de Ecología y Ambiente. Venezuela.
- Rovira, J.V. (1993) Estudio de la contaminación por metales pesados del Río Jarama. *Tesis Doctoral*. Madrid. 360 p.
- Sánchez, G., Vera, G. 2001. Manual introductorio de Ecotoxicología acuática. Informe 161. Instituto del Mar de Perú. Callao, Perú.
- Sandoval, C.M. 2008. Problema Global. Incremento Urbano, aguas residuales y la flora. CUDE. CEJUS. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/9653322/Problema-Global-to-Urbano-Aguas-Residuales-y-La-Flora>
- San Juan, Y. (2010). ¿Qué es la contaminación? *La contaminación y sus efectos*.
- Sanz-Sánchez, F. (1974). Sentido y posibilidades de la Toxicología Ambiental. *Curso Académico de la UCM*.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1995^a. Norma Mexicana NMX-AA-112-SCOFI. Análisis de agua y sedimentos. Evaluación de toxicidad aguda con *Photobacterium phosphoreum*. Método de prueba. DGN. 36 p.

- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1995b. Norma Mexicana NMX-AA-110-1995-SCOFI. Análisis de agua - Evaluación de toxicidad aguda con *Artemia franciscana* Kellogg CRUSTACEA-ANOSTRACA. Método de prueba. DGN. 26 p.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 2010. Norma Mexicana NMX-AA-087-SCOFI-2010. Análisis de agua - Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, Straus (Crustacea-Cladocera). Método de prueba. DGN. 44 p.
- Silva, T.M.S., Nascimento, R.J.B., Batista, M.M., Agra, M.F., Camara, C.A. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. Braz J Pharmacogn. 2007; 17(1):35-38.
- Solomon, F. 2008. Impacts of Metals on Aquatic Ecosystems and Human Health. Environment and Communities, 1(1), pp. 14-19.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Le, P., Tackaert, W., Versichele, D. (1986). Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura. Documento de campo No. 10. Universidad de Gent, Bélgica. (FAO) Roma, Italia. 301 p.
- Spiro, T.G., Stigliani, W.M., Madrid-Albarram, Y. (2004). Química medioambiental (2ª ed.). Madrid: Pearson Prentice Hall. 504 p.
- Stefanello, M.E.A., Salvador, M.J., Ito, I.Y., Macari, P.A.T. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* spp. *floccosa*. Braz J Pharmacogn. 2006; 16:525-530.
- Stumm, W., Morgan, J.J. (1984) Aquatic Chemistry. John Wiley and Sons. New York. 720 p.
- Talavera, V., Zapata, L.M., Sánchez, D. (1998). Ecología de las aguas dulces. La Tierra y su entorno. Recuperado de: http://www.latierraysuentorno.cl/Ecologia_aguas_dulces.htm
- Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielson, L.G., Muntau, H., Van Leeuwen, H.P., Lobinski, R. (2000). Guidelines for terms related to chemical

- speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure Appl. Chem.* 72(8):1453-70.
- Torokne, A., Vasdinnyi, R., Asztalos, B.M. A Rapid Microbiotest for the Detection of Cyanobacterial Toxins. *Environ Toxicol.* 2007: 64-68.
- Tortorelli, M., Hernández, D. Calidad de agua de un ambiente acuático sometido a efluentes contaminantes. *Ecosistemas de aguas continentales. Tomo I. Ediciones Sur. La Plata-ARGENTINA.* 1995. Pp. 217-230.
- Triantaphyllidis, G.V., Abatzopoulos, T.J., Sorgeloos, P. (1998). Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *Journal of Biogeography*, 25: 213-226.
- Trottier, S., Blaise, C., Kusui, T., Johnson, E. 1997. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuate* assay. *Environmental Toxicology and Water Quality* 12: 265:271.
- Valencia Espinoza, Christian Eduardo. (2011). *Química del hierro y manganeso en el agua, métodos de remoción.* (Tesis de pregrado). Facultad de Ingeniería Civil. Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus, C., Sorgeloos, P. (1981). Proposal for a Short-Term Toxicity Test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 5: 382-387.
- Vanhaecke, P., Persoone, G. The ARC-Test: a standardized short-term routine toxicity test with *Rev. Protección Veg. Vol. 25 No. 1 (2010) Artemia nauplii*. Methodology and evaluation. *Ecotoxicological Testing for the Marine Environ.* 1984; 143-157.
- Vargas-Camareno, M., Romero-Esquivel, L.G. (2006). Aprovechamiento de algunos materiales en el desarrollo de coagulantes y floculantes para el tratamiento de aguas en Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 19(4), 37.

- Vuori, K.1995. Direct and indirect effects of iron on river ecosystems. *Ann.Zool.Fennici* 32:317-329.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Silby, R.M., Peakall, D.B. 2006. Biomarkers in Principles of Ecotoxicology. 3rd ed. Taylor and Francis. Pp. 149-163.
- Wong, P., Dixon, D. 1995. Bioassessment of water quality. *Environmental Toxicology and Water Quality* 10: 9-17.
- Wood, J.M. (1989) Transport, bioacumulation and toxicity of elements in microorganisms under environmental stress. In: Proc Int Conf Heavy Metals in the Environment, Geneve. P. Vernet (ed) CEP Consultants Ltd, Edingurgh, UK 1-12.
- Zirino, A., Fuhrmann, R.A., Oksanen-Gooden, D., Lieberman, S.H., Clavell, C., Seligman, P.F., Mathewson, J.H., Jones, W.D., Kogelschatz, J., Barber, R.T. (1986). pH-temperature-nutrient relationships in the eastern tropical Pacific Ocean. *Sci. Total, Environ.* 58: 117–137.
- Zúñiga de Cardoso, M., Rojas, A., Caicedo, G. (1993). Indicadores ambientales de calidad de agua en la Cuenca del río Cauca. *Asociación de Ingenieros Sanitarios de Antioquia Medellín, Colombia.* 2: 17-28.