



---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *Daphnia  
Pulicaria* A DICROMATO DE POTASIO COMO  
MODELO TOXICOLÓGICO DE ALTA MONTAÑA**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**ARCELIA BEATRIZ ESTRADA AYALA**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. JOSÉ FERNANDO MÉNDEZ SÁNCHEZ**

Estado de México, julio 2022

# Índice de Contenido

<b>1. Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Antecedentes de la temática. ....</b>	<b>9</b>
3.1. Dicromato de potasio como tóxico de referencia .....	9
3.2. Dáphnidos como modelos en Toxicología.....	10
3.3. Dáphnidos en las Normas Mexicanas y en las Normas Internacionales .....	11
3.4. Daphnia pulicaria en lugar de Daphnia magna como organismo de referencia .....	12
<b>4. Importancia del problema. ....</b>	<b>14</b>
<b>5. Planteamiento del problema.....</b>	<b>15</b>
5.1. Pregunta General .....	15
5.2. Hipótesis .....	15
<b>6. Objetivos .....</b>	<b>16</b>
6.1. Objetivo General.....	16
6.2. Objetivos específicos.....	16
<b>7. Marco Teórico .....</b>	<b>17</b>
7.1. Toxicología .....	17
7.2. Toxicología acuática .....	17
7.3. Tóxico de Referencia.....	18
7.4. Toxicidad aguda, crónica y subcrónica.....	18

7.5. Concentración .....	19
7.6. CE <sub>50</sub> .....	19
7.7. Dosis .....	20
7.8. ¿Qué es un cladóceros? .....	20
7.9. Daphnia pulex .....	21
7.10. Ciclo biológico de Daphnia pulex .....	23
7.10.1. Sexual.....	23
7.10.2. Asexual.....	24
<b>8. Métodos y técnicas de investigación empleadas.</b> .....	<b>25</b>
8.1 Aislamiento .....	25
8.2 Purificación del Clon .....	25
8.3 Acondicionamiento del clon para experimento .....	26
8.4 Condiciones .....	27
8.5. Experimento.....	30
8.5.1. CE <sub>50</sub> .....	30
8.5.2. Efectos toxicológicos .....	31
8.6. Solución patrón de dicromato de potasio .....	33
8.7. Análisis Estadístico .....	34
<b>9. Resultados</b> .....	<b>35</b>
9.1 Sobrevivencia .....	35
9.2. Reproducción .....	37
9.2.1. Edad a la primera madurez.....	37

9.2.2. <i>Número de crías en la primera camada</i> .....	39
9.2.3 <i>Número de crías totales</i> .....	40
9.2.4. <i>Número de camadas totales</i> .....	42
9.3. Longevidad.....	43
<b>10. Discusión</b> .....	45
10.1 Sobrevivencia .....	45
10.1.1. <i>CE<sub>50</sub></i> .....	45
10.2 Reproducción .....	47
10.2.1. <i>Edad a la primera madurez</i> .....	47
10.2.2. <i>Número de crías en la primera camada</i> .....	48
10.2.3. <i>Número de crías totales</i> .....	48
10.2.4. <i>Número de camadas totales</i> .....	49
10.3 Longevidad.....	49
<b>11. Conclusiones</b> .....	50
<b>12. Referencias de consulta.</b> .....	52

## **1. Resumen.**

En éste trabajo se probó a *Daphnia pulicaria*, que es un cladóceros nativo de los cuerpos de agua continentales del centro de México, en lugar de *Daphnia magna* que es el modelo toxicológico de la NMX-AA-087-SCFI-2010 (SE, 2010), dado que, aparte de contar con las características de todo Dáphnido, específicamente *Daphnia pulicaria*, se puede encontrar de forma natural en los cuerpos de agua del Alto Lerma a una altitud aproximada de 2600 m.s.n.m. la cuál es considerada una de las zonas de México con fuertes problemas de contaminación urbana, industrial y agrícola

El objetivo de este trabajo fue utilizar a *Daphnia pulicaria* como modelo para medir los efectos en las variables de sobrevivencia, reproducción y longevidad, al exponerla de forma aguda al dicromato de potasio, tóxico de referencia establecido en la Norma Mexicana y poder evaluar su sensibilidad como organismo de prueba toxicológico, utilizando neonatos, periodo en que los individuos tienen menos de 48 horas de vida y dentro de las cuales son más sensibles al compuesto químico de referencia y organismos adultos de *Daphnia pulicaria*.

Como resultado de la exposición aguda a concentraciones de 0.6 mg/l, 1.05 mg/l, 2.1 mg/l, 3.15 mg/l y 4.2 mg/l de dicromato de potasio, se obtuvo que *Daphnia pulicaria* es sensible al tóxico de referencia, produciendo cambios significativos en todas las variables, mostrando que la concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) fue de 2.3 mg/l. A las 24 y 48 horas de exposición aguda se observó que en concentraciones menores a 0.5 mg/l el dicromato de potasio no produce la muerte de ningún individuo y en concentraciones iguales o superiores a 3.15 mg/l aniquilan al total de la población, para este experimento fueron utilizados

un total de 83 individuos de los cuales 20 fueron expuestos a concentraciones mayores a 3.15 mg/l. En cuanto a las variables de reproducción como edad a la primera madurez, número de crías en la primera camada, número de crías totales y número de camadas totales, solo hubo individuos sobrevivientes a las concentraciones de 0.6 y 2.1 mg/l de dicromato de potasio, de las cuales, se mostraron diferencias significativas ( $p < 0.0005$  por una comparación de medianas no paramétricas) de forma negativa en todas las variables. De igual manera, la longevidad se vio afectada negativamente por el efecto de la concentración del tóxico.

Los resultados obtenidos muestran que *Daphnia pulicaria* proporciona información adecuada para ser un modelo toxicológico similar a *Daphnia magna*, efectivo y sensible al dicromato de potasio, tóxico de referencia establecido por la NMX-AA-087-SCFI-2010 (SE, 2010).

## **Abstract**

In this work, *Daphnia pulicaria*, which is a cladoceran native to inland water bodies in central Mexico, was tested instead of *Daphnia magna*, which is the toxicological model of NMX-AA-087-SCFI-2010 (SE, 2010 ) given that, apart from having the characteristics of all Daphnids, specifically *Daphnia pulicaria* can be found naturally in the water bodies of Alto Lerma Basin at an approximate altitude of 2600 m.a.s.l. which is considered one of the areas of Mexico with strong problems of urban, industrial and agricultural pollution.

The objective of this work was to use *Daphnia pulicaria* as a model to measure the effects on the variables of survival, reproduction and longevity, by exposing it acutely to potassium dichromate, a reference toxicant established in the Mexican Standard, and to be able to evaluate its sensitivity as toxicological test organism, using neonates, the period in which individuals are less than 48 hours old and within which they are most sensitive to the reference chemical compound, and adult organisms of *Daphnia pulicaria*.

As a result of acute exposure to concentrations of 0.6 mg/l, 1.05 mg/l, 2.1 mg/l, 3.15 mg/l and 4.2 mg/l of potassium dichromate, it was found that *Daphnia pulicaria* is sensitive to the reference toxicant, producing significant changes in all variables, showing that the mean effective concentration (EC50) was 2.3 mg/l. At 24 and 48 hours of acute exposure it was observed that at concentrations less than 0.5 mg/l potassium dichromate does not kill any individual and at concentrations equal to or greater than 3.15 mg/l they annihilate the entire population , for This experiment a total of 83 individuals were used, of which 20 were exposed

to concentrations greater than 3.15 mg/l. Regarding the reproductive variables such as age at first maturity, number of offspring in the first litter, number of total offspring and number of total litters, there were only surviving individuals at concentrations of 0.6 and 2.1 mg/l of potassium dichromate, of which significant differences were shown ( $p < 0.0005$  for a non-parametric median comparison) negatively in all variables. Similarly, longevity was negatively affected by the effect of the concentration of the toxicant.

The results obtained show that *Daphnia pulicaria* provides adequate information to be a toxicological model similar to *Daphnia magna*, effective and sensitive to potassium dichromate, a toxic reference established by NMX-AA-087-SCFI-2010 (SE, 2010).



## **2. Introducción**

Una de las principales tareas de hoy en día es la evaluar la calidad de agua para poder así determinar lo efectos toxicológicos de compuestos químicos que llegan en los sistemas acuáticos derivados de las actividades humanas. En nuestro país la inclusión de criterios biológicos en la normatividad en materia ambiental, es apenas una medida inicial, pues se sustenta en estándares de calidad ambiental que se basan en niveles máximos permisibles para algunos contaminantes, pero sin que exista una evaluación biológica que permita determinar si tales estándares son en realidad efectivos para lograr la protección de la vida acuática (Martínez-Jerónimo *et al.*, 2008).

Para evaluar los efectos toxicológicos que tiene un contaminante, se llevan a cabo pruebas de toxicidad mediante una exposición controlada de organismos de prueba, a concentraciones establecidas de un determinado compuesto químico o directamente en diluciones de muestras de agua contaminada, cuya toxicidad se requiera determinar. Esto permite conocer la concentración efectiva media, que es cuando el 50% de la población muere (CE<sub>50</sub>), en un tiempo de exposición determinado (Martínez-Jerónimo *et al.*, 2008).

Estas pruebas de toxicidad acuática o bioensayos son utilizados para detectar y evaluar los efectos potenciales toxicológicos que tiene un contaminante químico sobre un organismo acuático, estas pruebas proporcionan información de referencia, valiosa en el proceso de evaluación de los riesgos ambientales por compuestos químicos y tiempo de exposición (Villamarín-Jiménez *et al.* 2013).

Para llevar a cabo una correcta evaluación de los efectos tóxicos de los contaminantes químicos es importante realizar una adecuada elección del organismo de prueba a utilizar, por cuestiones prácticas, relacionadas con su fácil cultivo, manejo e importancia ecológica, con frecuencia se utilizan especies de tipo planctónicas, particularmente los cladóceros, organismos fundamentales y dominantes en la comunidad zooplanctónica (Freitas y Rocha, 2011). Entre los cladóceros, la especie más utilizada es *Daphnia magna*, la cual ha sido propuesta como organismo de referencia en múltiples protocolos estandarizados de entidades reguladoras y organismos internacionales involucrados en la normalización de procedimientos de prueba (Martínez-Jerónimo *et al.* 2000).

Para la evaluación de la calidad de agua en sistemas acuáticos, la información existente sobre toxicología de especies de zonas tropicales y subtropicales en normas nacionales e internacionales es prácticamente nula, por lo que los países de este tipo de regiones, emplean criterios para medir la calidad de agua desarrollados para especies de regiones templadas, lo que pone en duda el alcance real de los resultados obtenidos con especies que no son propias de las regiones (Kwok, *et al.* 2007). Evidencia de esto se presenta en la normatividad ambiental de México, en la que se incluyen diferentes pruebas para la evaluación de la toxicidad, y en una de estas pruebas se utiliza a *Daphnia magna* como organismo de referencia, pese a que este cladóceros no es nativo de ésta región y se distribuye de manera natural en lagos templados de la región del Norte de África, Europa y Asia (Martínez-Jerónimo *et al.*, 2008).

Por ésta razón, es importante aumentar los modelos de referencia para pruebas de toxicología acuática, ya que son limitados los organismos

estandarizados para realizar evaluaciones de efectos tóxicos por contaminantes químicos (Martínez-Jerónimo, *et al.*, 2008).

Es necesario proponer especies que ayuden a la ecología a obtener información más adecuada, de acuerdo a las condiciones ambientales del ecosistema acuático que prevalece en áreas geográficas que no están incluidas en las zonas templadas del mundo y de las cuales no se cuentan con organismos endémicos para hacer este tipo de pruebas toxicológicas (Martínez-Jerónimo, *et al.*, 2008).

Una propuesta para utilizar como organismo de referencia endémico del centro de México, es un cladóceros identificado como *Daphnia pulicaria* (Elías-Gutiérrez, *et al.* 2008), que es un cladóceros nativo de los cuerpos de agua continentales del centro de México, en lugar de *Daphnia magna*, modelo toxicológico estandarizado a nivel internacional para realizar pruebas de toxicidad acuática y utilizado como organismo de referencia por la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010 Análisis de agua - evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, Straus (Crustacea - Cladocera) - Método de prueba (SE, 2010).

Como se mencionó anteriormente, de manera muy general, el género *Daphnia*, se caracteriza principalmente por tener un ciclo de vida corto, por ser de fácil mantenimiento y es muy utilizado como organismo para evaluar efectos toxicológicos en variables como sobrevivencia, crecimiento y reproducción por su tipo de reproducción (Freitas y Rocha 2011), específicamente la especie *Daphnia pulicaria*, aparte de contar con éstas características, se puede encontrar de forma natural en los cuerpos de agua del Alto Lerma a una altitud aproximada de 2600 m.s.n.m. la cuál es considerada una de las zonas de México con fuertes problemas de contaminación urbana, industrial y agrícola (Elías-Gutiérrez, *et al.*

2008); por lo que, éste cladóceros podría ser una propuesta de organismo de referencia, muy puntual y natural, de los efectos de la contaminación por compuestos químicos en organismos acuáticos propio de esta región.

### **3. Antecedentes de la temática.**

#### **3.1. Dicromato de potasio como tóxico de referencia**

El dicromato de potasio ha recibido bastante atención en los métodos internacionales de pruebas por presentar características como: tener disponibilidad con pureza consistente, solubilidad en agua, letalidad rápida, toxicidad no específica y estabilidad (Vargas-Bernal y Ramírez-Forero, 1993).

Este tóxico de referencia es utilizado en la NMX-AA-087-SCFI-2010 (SE, 2010) para medir la toxicidad acuática utilizando *Daphnia magna*, por lo tanto, para poder estandarizar los efectos en *Daphnia pulicaria* es necesario utilizar el mismo tóxico establecido en la Norma Mexicana y compararlo con nuestro control.

Este compuesto químico ha sido utilizado en experimentos para evaluar los efectos que se presentan por su toxicidad en las variables de sobrevivencia (CE<sub>50</sub>) a las 12, 24 y 48 horas y la reproducción en *Moina micrura*, especie encontrada en el lago de la ciudad de Da Nang en Vietnam, utilizando diferentes concentraciones y exponiendo de forma aguda y crónica a los huevos, neonatos y adultos, dando como resultado que *Moina micrura* fue más sensible al tóxico que *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* y *Cyclura cornuta*. (Trinh-Dang, *et al.*, 2019)

Otro ejemplo, es la realización de pruebas toxicológicas en Europa y USA con *Daphnia magna* para determinar los efectos ecológicos por productos químicos, utilizando como tóxico de referencia el dicromato de potasio y la influencia que tiene la calidad del agua como la dureza total, alcalinidad y la relación Ca:Mg sobre la toxicidad de dicromato de potasio en *Daphnia magna* (Hans-Günter, 1980).

### 3.2. Dáphnidos como modelos en Toxicología

La especie del género *Daphnia* más utilizada para experimentos toxicológicos y de epigenética es *Daphnia magna*, la cual ha sido adoptada como organismo modelo en todo el mundo, en pruebas de toxicidad, pese a que su utilidad en ambientes tropicales y subtropicales es cuestionada (Martínez-Jerónimo, *et al.*, 2008).

Las pulgas de agua del género *Daphnia*, han sido modelos epigenéticos (Bonasio, 2015) basados en el nivel de metilación global de citosina (marcador molecular de eventos epigenéticos en CpG) producidos por diferentes factores asociados a los contaminantes químicos, a la dieta, a las relaciones ecológicas y la calidad de agua (Asselman, *et al.*, 2015).

Otro ejemplo, donde el género *Daphnia* ha sido utilizado para evidenciar el desvanecimiento de los efectos epigenéticos en la masa corporal evaluados de forma inter e intra generacionales, es el de Andrewata y Burggren (2012). En este se observa como los efectos promovidos por la exposición aguda en un ambiente hipóxico se desvanecen en la tercera generación y tercera camada.

Como modelo toxicológico algunos cladóceros como *Daphnia magna*, *Daphnia axilis*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dubia* y *Moina macrocopa* son utilizados para medir la concentración media letal (CL<sub>50</sub>) para diferentes productos tóxicos especialmente de uso agrícola e industrial (Martínez-Jerónimo, *et al.*, 2008).

También se ha utilizado dentro de la industria minera para medir la contaminación por metales pesados y otros contaminantes liberados al ambiente cuando no se realiza un control adecuado de toxicidad al realizar la extracción de metales pesados como el cromo hexavalente y el cianuro (Núñez, *et al.*, 2005).

En otro caso particular, *Daphnia magna* se utiliza como modelo toxicológico para la evaluación del efecto combinado de epoxiconazol y  $\alpha$ -cipermetrina en el crecimiento, la reproducción y el tamaño de sus neonatos (Gottardi, *et al.*, 2017).

### **3.3. Dáphnidos en las Normas Mexicanas y en las Normas Internacionales**

El género *Daphnia* es muy utilizado en normas internacionales y nacionales como modelo para estudios ecotoxicológicos, genéticos y epigenéticos por su ciclo de vida corto y reproducción partenogenética, es un representante importante de las comunidades dulceacuícolas con gran sensibilidad a una amplia gama de compuestos tóxicos, siendo esta una de las características principales por lo que es utilizado internacionalmente. Son especies de fácil cultivo en el laboratorio lo que permite realizar pruebas rápidas y económicas (Martínez, *et al.*, 1997). Lo anterior permite generar clones libres de efectos epigenéticos por varias generaciones y en poco tiempo.

En metodologías estandarizadas de toxicología se recomienda el uso de neonatos, estos son juveniles que cuentan con menos de 24 horas de haber sido expulsados de la hembra, ya que constituye la etapa más sensible a los efectos tóxicos, es sumamente importante mantener controlados y estandarizados los principales factores como temperatura, concentración de sales, fotoperiodo y oxígeno disuelto constantes siguiendo los criterios de la NMX-AA-087-SCFI-2010 (SE, 2010) y para la alimentación los criterios de Martínez (1997), ya que éstos influyen sobre las características de la progenie, permitiendo reducir considerablemente la variación de los resultados toxicológicos.

La exposición a compuestos tóxicos puede provocar un estrés que genere cambios en las generaciones futuras de tipo genético en la especie o epigenético: cambios fenotípicos heredables sin cambio en la secuencia de los genes (Burggren, 2015; Harris, *et al.*, 2016), determinados con la evaluación de los cambios en las variables de sobrevivencia, longevidad, crecimiento, reproducción y morfología.

De forma nacional para realizar pruebas de calidad de agua se citan métodos como la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010 Análisis de agua - evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, Straus (Crustacea -Cladocera) - Método de prueba (SE, 2010).

Y de forma internacional se citan métodos para el manejo de *Daphnia magna* como en la ISO 6341 de Calidad de agua – Determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* Straus (Cladóceras, Crustacea), prueba de toxicidad aguda elaborado por la Asociación Española de Normalización y Certificación del Comité Técnico AEN/CTN 77 Medio Ambiente (UNE-EN, 2013) y en los procedimientos para conducir bioensayos de toxicidad en *Daphnia magna* por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, 2002).

### **3.4. *Daphnia pulicaria* en lugar de *Daphnia magna* como organismo de referencia**

Debido a que *Daphnia pulicaria* es un habitante natural de las Ciénegas del Alto Lerma, las cuales están por arriba de los 2600 m.s.n.m. (Gliwicz y Boavida, 1996; Elías-Gutiérrez, *et al.*, 2008), está adaptado a la hipoxia altitudinal de forma natural; se sugiere como un modelo alta montaña y de climas templados y fríos, a diferencia de *Daphnia magna* que se ha utilizado en los climas templados de Norte América y Europa a bajas altitudes sin el efecto de la hipoxia altitudinal. Se propone a *Daphnia*



*pulicaria* como un modelo para medir los efectos toxicológicos y epigenéticos de una manera más realista ya que esta pulga de agua es nativa de la zona de la cuenca Alta de Lerma, además de que es una de las cuencas más contaminadas del país (Maderey y Jiménez, 2001) por lo que contar con un organismo de prueba local, abarata los costos de mantenimiento ya que no se requiere invertir en mantener la temperatura y el fotoperiodo y la extrapolación que se puede hacer de los resultados es aplicable directamente a los organismos de cuerpos de agua locales.

Por otro lado, *Daphnia pulicaria* ha sido utilizada como modelo sensible a las oxilipinas secretadas por diferentes especies de diatomeas como respuesta al forrajeo, ésta especie se vio afectada de forma negativa en su crecimiento, reproducción, sobrevivencia y longevidad comparada con una dieta de diatomeas más *Scenedesmus sp.* (Carotenuto, *et al.*, 2005).

Este cladóceros también ha presentado respuestas inter poblacionales en sus características de historia de vida a diferentes niveles de limitación alimenticia algunas de éstas características son la edad a la primer reproducción y en la tasa de producción de huevos (Olijnyk, 2011). Todas estas características hacen de *Daphnia pulicaria* un animal acuático con características adecuadas para ser un modelo en el estudio toxicológico y epigenético.

Debido a que no existe información toxicológica muy específica de *Daphnia pulicaria* se compararán los resultados con experimentos realizados con *Daphnia magna*.

#### **4. Importancia del problema.**

Es importante generar un modelo toxicológico de alta montaña porque los modelos actuales de animales acuáticos están basados en *Daphnia magna* organismo que a esta altitud no se reproduce de forma natural en los cuerpos de agua, por el contrario, *Daphnia pulicaria* se encuentra presente en los ecosistemas del alto Lerma característicos por pertenecer a una altitud arriba de los 2400 msnm, por lo que, para realizar experimentos más viables y con organismos propios del hábitat, de fácil obtención y cultivo, se utilizará un modelo propio de la zona como *Daphnia pulicaria* que es un habitante natural de los ecosistemas y por lo tanto, éste trabajo se ajustará al protocolo establecido en la NMX-AA-087-SCFI-2010 (SE, 2010), que contempla los procedimientos estandarizados a nivel internacional para evaluar la sensibilidad de *Daphnia pulicaria* sometida al tóxico de referencia que es dicromato de potasio, dentro de esta norma se consideran las variables de sobrevivencia a las 24 y 48 horas y longevidad y aparte se considerarán las variables de reproducción medidas como: edad a la primera madurez, número de crías en la primer camada, número de camadas, número de crías promedio por camada y número de crías totales.

## **5. Planteamiento del problema**

### **5.1. Pregunta General**

¿Son la sobrevivencia y la reproducción de *Daphnia pulicaria* características sensibles al dicromato de potasio de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana que evalúa la toxicidad aguda de *Daphnia magna*?

### **5.2. Hipótesis**

*Daphnia pulicaria* será un modelo sensible para evaluar los efectos toxicológicos agudos, ya que su sobrevivencia y reproducción serán modificados en relación a la concentración de dicromato de potasio de acuerdo a la Norma Mexicana que evalúa la toxicidad aguda de *Daphnia magna*.

## **6. Objetivos**

### **6.1. Objetivo General**

Evaluar la sobrevivencia y la reproducción de *Daphnia pulicaria* al exponerla de forma aguda al tóxico de referencia establecido en la Norma Mexicana (dicromato de potasio) para evaluar su sensibilidad como organismo de prueba toxicológico.

### **6.2. Objetivos específicos**

1. Determinar la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de dicromato de potasio que tiene efectos letales sobre neonatos de *Daphnia pulicaria*.
2. Determinar el efecto de una exposición aguda a diferentes concentraciones de dicromato de potasio sobre la sobrevivencia a las 24 y 48 horas y la longevidad de *Daphnia pulicaria*.
3. Determinar el efecto de una exposición aguda a diferentes concentraciones de dicromato de potasio en la edad a la primera reproducción, número de crías en la primer camada, número de crías totales, número de camadas y número de crías promedio por camada de *Daphnia pulicaria*.

## **7. Marco Teórico**

### **7.1. Toxicología**

La palabra toxicología puede ser definida como la rama de la ciencia que se ocupa del estudio de los venenos. Una vez definido, podemos decir que un tóxico es toda radiación física o agente químico que, al entrar en contacto, generarse de manera interna, penetrar o ser absorbido por un organismo vivo, en una dosis suficientemente alta, puede producir un efecto adverso directo o indirecto en el mismo (Roldán-Reyes, 2016). La medida de este efecto para algunas sustancias puede variar dependiendo de la dosis aplicada, en una dosis lo suficientemente baja, no se presenta efecto, mientras que en muchos sino es que en la mayoría, la sustancias tienen efectos letales en algunas dosis más altas (Giannuzzi, 2018).

La mayoría de efectos toxicológicos suelen ser presentados como respuesta a compuestos xenobióticos, que son compuestos externos al metabolismo normal de los organismos. Sin embargo, también se pueden encontrar muchos compuestos endógenos o internos incluyendo intermediarios metabólicos, que pueden ser tóxicos cuando son administrados en dosis más altas a las naturales (Roldán-Reyes, 2016).

### **7.2. Toxicología acuática**

La toxicología acuática consiste en medir el efecto que tiene un tóxico en la sobrevivencia y ciclo de vida de los organismos acuáticos, los cuales están expuestos porque su capacidad de dispersión está limitada al agua,

por lo que son vulnerables. Una forma de medir el efecto es a partir de la sobrevivencia de los organismos (Rand, *et al.* 2020).

### **7.3. Tóxico de Referencia**

Un tóxico de referencia es una sustancia orgánica o inorgánica utilizada en pruebas de toxicidad con fines de control de calidad analítica de los organismos a utilizar en las diferentes pruebas, para ello, en la etapa inicial del montaje de un experimento, se debe seleccionar un compuesto de tipo soluble, de pureza igual o mayor al 99%, al cual se le deben realizar pruebas de toxicidad con una especie determinada con el fin de establecer el intervalo de concentración del compuesto, una vez definido el patrón de la relación dosis-respuesta para el compuesto elegido, puede ser empleado como compuesto tóxico de referencia (SE, 2010).

### **7.4. Toxicidad aguda, crónica y subcrónica**

Una prueba de toxicidad aguda consiste en la exposición en una sola ocasión a grupos pequeños de organismos, más un grupo control, a un número de dosis diferentes del compuesto tóxico a probar, el cual se administra al inicio del estudio. Los animales se examinan periódicamente, se registran los signos clínicos y los síntomas de toxicidad. Después de un intervalo de tiempo, se cuenta el número de animales muertos en cada grupo de dosis y en el grupo control, los resultados son analizados estadísticamente como función de la dosis. En estudios de toxicidad aguda, la dosis media se refiere como la dosis letal media o  $CE_{50}$ , y se deriva de estudios de toxicidad aguda, donde la mitad de los animales de prueba mueren y la otra mitad sobrevive (Roldán Reyes, E. 2016).

Una prueba de toxicidad crónica en pequeños mamíferos puede cubrir la vida útil entera del adulto de la especie de prueba (Roldán Reyes, E. 2016).

A diferencia del tiempo de exposición en las pruebas de toxicidad aguda, las de toxicidad subcrónica implica dosis repetidas del compuesto químico a probar, normalmente se administra por un periodo de aproximadamente 90 días (Roldán Reyes, E. 2016).

### **7.5. Concentración**

Es la concentración de sustancias, combinadas, cuerpos receptores, efluentes, lixiviados y la fracción soluble de los de suelos y sedimentos que afecta al 50 por ciento de la población expuesta, por un periodo de exposición de 24 o 48 h. La norma Mexicana utiliza diferentes concentraciones de un tóxico de referencia para encontrar la Concentración Efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) (SE, 2010).

### **7.6. CE<sub>50</sub>**

La Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>), Concentración Letal 50 (CL<sub>50</sub>), Concentración Efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) o Concentración Efectiva Media (CE) hace referencia a aquella dosis de un compuesto químico que causa la muerte del 50% de los organismos de prueba. Para efecto de estandarización para éste texto se utilizará CE<sub>50</sub> como estandarización de la NMX-AA-087-SCFI-2010 (SE, 2010). La CE<sub>50</sub> es un valor virtual que se obtiene estadísticamente. Consiste en un valor calculado que representa la mejor estimación de la dosis requerida para producir la muerte en el 50% de los organismos y, por lo tanto, siempre va acompañada de algunos tipos de estimación del error del valor hallado, tal como su intervalo de confianza (Roldán-Reyes, 2016).

La  $CE_{50}$  puede ser determinada construyendo la curva de la dosis-respuesta y examinando el efecto de diversas concentraciones del toxón en la sobrevivencia o inactividad de la especie modelo (Roldán-Reyes, 2016).

### 7.7. Dosis

Es la cantidad de un químico aplicado o introducido en un sistema biológico u organismo en un tiempo determinado, la forma más común de definir una dosis es mediante el peso del agente químico (g), el peso del organismo experimental (g/kg) o por tiempo (día), en la Norma Mexicana se utiliza la concentración efectiva media por lo que para éste texto se utilizará la concentración en mg/l (Roldán Reyes, E. 2016).

### 7.8. ¿Qué es un cladócero?

Los cladóceros son crustáceos de tamaño pequeño conocidos comúnmente como pulgas de agua, son micro-crustáceos, usualmente con un tamaño menor de 1 mm de longitud que han evolucionado principalmente en agua dulce (Elías-Gutiérrez, *et al.*, 2008). Estos microcrustáceos

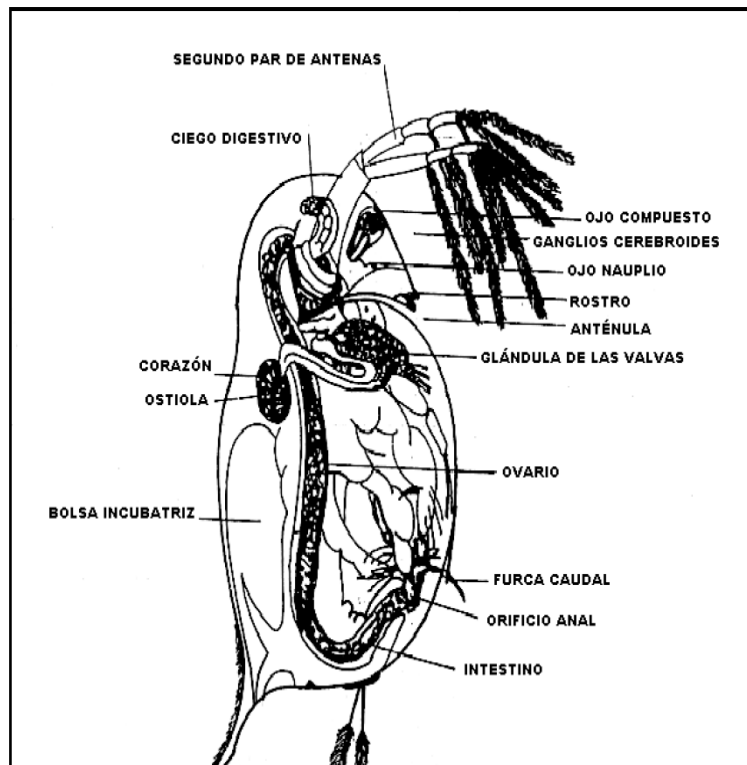


Figura 1. Morfología general del género *Daphnia* obtenido de la NMX-AA-087-SCFI-2010.



conforman un grupo evolucionado de un ancestro en común y son un importante componente de la comunidad zooplanctónica de los sistemas acuáticos epicontinentales. Se conocen aproximadamente 620 especies y se considera que alrededor de 200 se encuentran en la región Neotropical en el continente Americano (Forró, *et al.*, 2008).

La morfología general de los cladóceros presenta tagmas poco claros; sin embargo es posible observar la cabeza separada del tórax; posteriormente se encuentra un postabomen no articulado al tórax, seguido por un par de uñas terminales, un rasgo característico de todos los cladóceros es el caparazón. Hacia la región ventral del cuerpo, los cladóceros tienen apéndices articulados, tanto en la cabeza como en el tórax (Cervantes, *et al.*, 2012), son muy utilizados por ser fáciles de cultivar.

### **7.9. *Daphnia pulicaria***

*Daphnia pulicaria* Forbes, 1893 es un cladócero perteneciente al complejo pulex, los cuales presentan un pecten medio de la garra postabdominal mucho más desarrollado que el anterior y el proximal, un margen interno del caparazón con setas relativamente largas, sobre todo hacia la parte medio ventral.

La característica principal por la cual se define *Daphnia pulicaria* es que tiene ocelos presentes y la punta de los estetascos de la anténula no sobrepasan la punta del rostro, también tienen un montículo antenular poco desarrollado, la espina del caparazón corta menor a un tercio de la longitud del mismo (Martínez-Jerónimo, *et al.*, 2008 y Elías-Gutiérrez y Valdéz-Moreno).

El complejo pulex se ha registrado en la siguientes localidades Presa José Antonio Alzate, Jilotepec-Ixtlahuaca km 28 y 41, Laguna los Baños en el

Estado de México (Eliás-Gutiérrez y Valdéz-Moreno 2008), por lo que puede considerarse un habitante natural de los cuerpos del Alto Lerma.

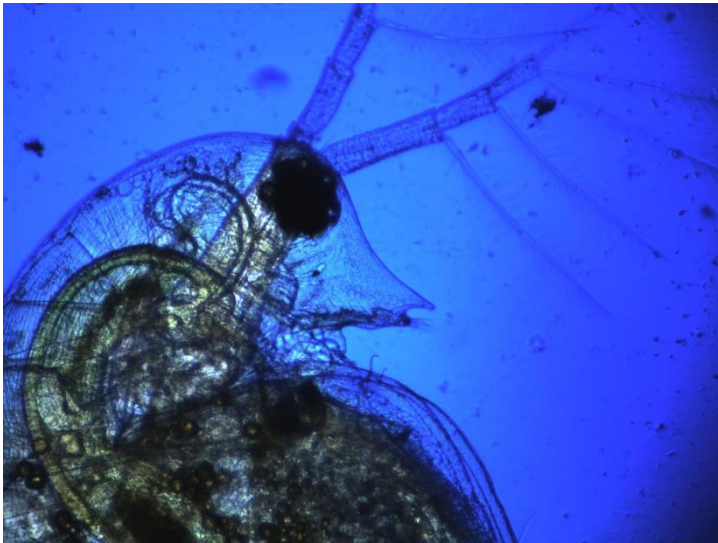


Figura 2. Cabeza de un individuo adulto de *Daphnia pulex*, donde se puede observar su ocelo, anténulas y parte de su tracto digestivo, vista bajo microscopio óptico a 4X y tinción de azul de metileno.

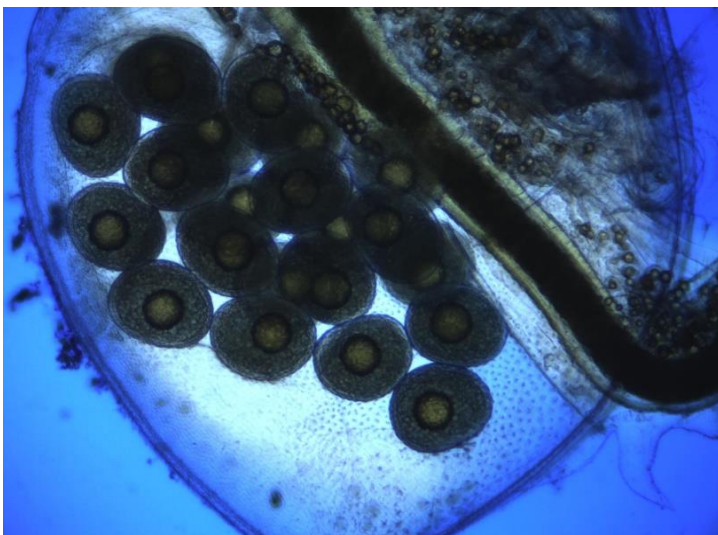


Figura 3. Tronco de un individuo adulto de *Daphnia pulex*, donde se observan aproximadamente 20 huevos haploides con crecimiento embrionario y parte media de su tracto digestivo, vista bajo microscopio óptico a 4X y tinción de azul de metileno.

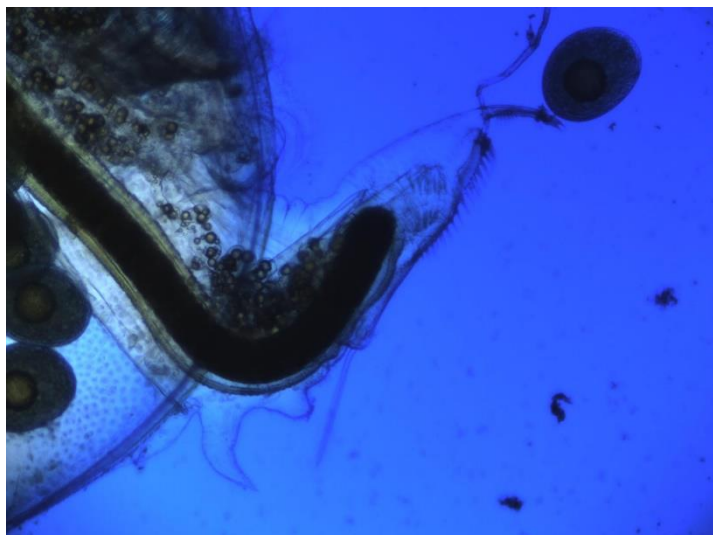


Figura 4. Postabdomen y parte final del intestino de un individuo adulto de *Daphnia pulicaria*, vista bajo microscopio óptico a 4X.

### **7.10. Ciclo biológico de *Daphnia pulicaria*.**

Una de las razones por la que los cladóceros son muy utilizados en pruebas de toxicidad como biomarcadores es su tipo de reproducción, la cual presenta dos fases (Núñez, *et al.*, 2005).

#### *7.10.1. Sexual*

Si las condiciones ambientales no son favorables y presentan cambios de temperatura y cantidad de alimento variable, *Daphnia* llevará a cabo una reproducción sexual, donde la producción de generaciones de hembras cesa y comienza una producción de machos por partenogénesis, los machos se presentan en menor cantidad que las hembras y normalmente poseen un apéndice abdominal especializado que es usado en el apareamiento y poder fertilizar los huevos. La producción de los huevos se destina para asegurar la supervivencia de la población en periodos en los que predominen condiciones poco favorables. Estos huevos son de resistencia y se caracterizan por estar cubiertos de una capa extra, rica en queratina, llamada efipio, misma que se origina a partir de una

cámara incubadora en la que las hembras almacenan los huevos. Esta capa extra preserva y protege al huevo hasta que el ambiente sea favorable nuevamente (Núñez, *et al.*, 2005).

#### 7.10.2. Asexual

En condiciones ambientales favorables como la temperatura y la cantidad de alimento adecuada y constante, *Daphnia* presentará la fase asexual y mantendrá de forma continua su reproducción por partenogénesis o clonal, lo que permitirá trabajar con poblaciones de individuos genéticamente iguales, manteniendo una población solo de hembras (Núñez, *et al.*, 2005).

## **8. Métodos y técnicas de investigación empleadas.**

### **8.1 Aislamiento**

*Daphnia pulicaria* fue colectado en el bordo las Maravillas del campus el Cerrillo de la UAEM, en Toluca de Lerdo, Estado de México, posteriormente fue trasladada para su cultivo al Laboratorio de Ecofisiología Animal en la Facultad de Ciencias donde se purificó de efectos epigenéticos y se mantuvo por más de 20 generaciones en condiciones estandarizadas de acuerdo a la NMX-AA-087-SCFI-2010 (NMX).

### **8.2 Purificación del Clon**

Se preparó agua dura reconstituida (Tabla 1) en las condiciones ambientales y de alimentación descritas en el siguiente apartado, en donde se aisló una pulga ( $F_0$ ) para favorecer la reproducción partenogenética, se obtuvieron neonatos de los cuales se aisló uno y se mantuvo vivo hasta su tercer evento reproductivo, de ahí se aisló un neonato y así sucesivamente por más de 20 generaciones.

La madre de la  $F_0$  se identificó con la clave para Cladóceras y Copépodos de las Aguas Continentales de México de Elías-Gutiérrez, M. *et al.*, 2008.

### 8.3 Acondicionamiento del clon para experimento

Dispositivo para mantener la temperatura: Se trabajó en un baño de agua de 15 litros acondicionada para mantener vasos de precipitado de 10 ml sumergidos en agua hasta 2/3 de profundidad, la temperatura se mantuvo constante a  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  dentro de los vasos.



Figura 5. Baño de agua para controlar las condiciones ambientales para el cultivo de *Daphnia pulicaria* obtenido de la NMX-AA-087-SCFI-2010.

#### **8.4 Condiciones**

Se trabajó colocando una pulga en un vaso de precipitado de 10 ml bajo las condiciones ambientales para el cultivo y mantenimiento de organismos de *Daphnia magna*, apéndice Normativo A de la Norma Mexicana 26/39 (SE, 2010), como se menciona a continuación:

Se contó con un área libre de sustancias tóxicas, se utilizó agua dura reconstituida cuya preparación se describe en la Tabla 1, se instaló una iluminación de 600lx a 1000lx con fotoperiodo de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad con una lámpara de luz blanca LED, se mantuvo una temperatura de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , niveles de oxígeno de 2mg/L, una dureza de 250 mg/L  $\text{CaCO}_3 \pm 25$  mg/L, pH de  $8.0 \pm .2$ , se llevó a cabo el recambio de agua dos veces por semana, el alimento estuvo constituido por *Desmodesmus* sp., el cual se realizó hasta 3 veces por semana a una concentración de 750,000 a 800,000 células/mL, las cuales fueron cultivadas en base al apéndice normativo B de la Norma Mexicana 29/39 (SE, 2010).

**Tabla 1. Preparación de soluciones stock para la elaboración del agua dura reconstituida.**

<b>Disolución</b>	<b>Preparación stock</b>	<b>Preparación de agua dura reconstituida para 1 L.</b>
Disolución de cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).	Disolver 11.76 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L.	Agregar 25 mL de la disolución stock.
Disolución de sulfato de magnesio pentahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).	Disolver 4.93 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L.	Agregar 25 mL de la disolución stock.
Disolución de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ).	Disolver 2.59 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L.	Agregar 25 mL de la disolución stock.
Disolución de cloruro de potasio (KCl).	Disolver 0.23 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L.	Agregar 25 mL de la disolución stock.
Disolución de selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ).	Disolver 0.001 g del reactivo en agua destilada y aforar a 100 mL.	Agregar 25 mL de la disolución stock.

*Obtenido de la NMX-AA-087-SCFI-2010.*





Figura 6. Cultivo de algas (*Desmodesmus s.p.*) para alimento de *Daphnia pulicaria* obtenido de la NMX-AA-087-SCFI-2010.



Figura 7. *Desmodesmus s.p.* utilizado para mantener constante la alimentación de *Daphnia pulicaria*.

Los organismos de prueba utilizados para la exposición al tóxico fueron neonatos de menos de 24h de nacidos y de la tercera generación en adelante.

Se favoreció la reproducción de forma asexual controlando las variables de cultivo antes mencionadas y manteniéndolas constantes a lo largo de todo el proceso, asegurando la reproducción asexual de los individuos y garantizando que fueran clones genéticamente iguales a sus progenitoras, esto permitió estandarizar las variables de crecimiento, reproducción y longevidad y poder comparar las diferencias entre tratamientos y concentraciones. Durante todo el experimento no hubo presencia de machos, lo cual aseguro ausencia de reproducción sexual y la aclimatación del clon a condiciones constantes.

## **8.5. Experimento**

### *8.5.1. CE<sub>50</sub>*

La concentración efectiva 50 se determinó con una exposición aguda al dicromato de potasio disuelto en agua dura reconstituida a las 24 y 48 horas, se contó el número de sobrevivientes en los 2 periodos de tiempo. Se realizó una gráfica con la concentración de dicromato de potasio (mg/l) con respecto a la proporción de sobrevivientes. La CE<sub>50</sub> se determinó interpolando el valor de la concentración de dicromato de potasio que correspondió a la proporción de 0.5 de sobrevivientes.

### 8.5.2. Efectos toxicológicos

Se realizó un experimento de exposición aguda con cinco concentraciones una como control, solo con agua dura reconstituida y otras con agua dura reconstituida más dicromato de potasio en diferentes concentraciones (0.6 mg/l, 1.05 mg/l, 2.1 mg/l, 3.15 mg/l, 4.2 mg/l), usando como referencia la de la Norma Oficial Mexicana (SE, 2010) que fue de 2.4 mg/l, en ellas se evaluó su efecto en reproducción, longevidad y sobrevivencia (Figura 8).

Se consideró al clon libre de efectos epigenéticos siguiendo lo recomendado por Andrewartha y Burggren (2012), a partir de la tercera camada de la primer madre ( $F_{m1}$ ) se obtuvieron 3 hijas ( $F_{m2}$ ) que fueron genéticamente idénticas a la madre y entre sí, de la tercera camada de estas se seleccionaron hijas ( $F_0$ ) de cada una para el experimento de exposición aguda al dicromato de potasio ya que las camadas de *Daphnia pulicaria* no son tan prolíficas.

En total se utilizaron 10 hijas por cada concentración y el control, de diferente madre, hermanas del mismo clon, eliminando así el efecto posible que pudiera haber entre madres, teniendo finalmente un total de 73 hijas.

Cada grupo de neonatos, fue sometido a un tratamiento (control, y dicromato de potasio según Gopi *et al*, (2012) de exposición aguda durante 48 horas como indicó la NMX.

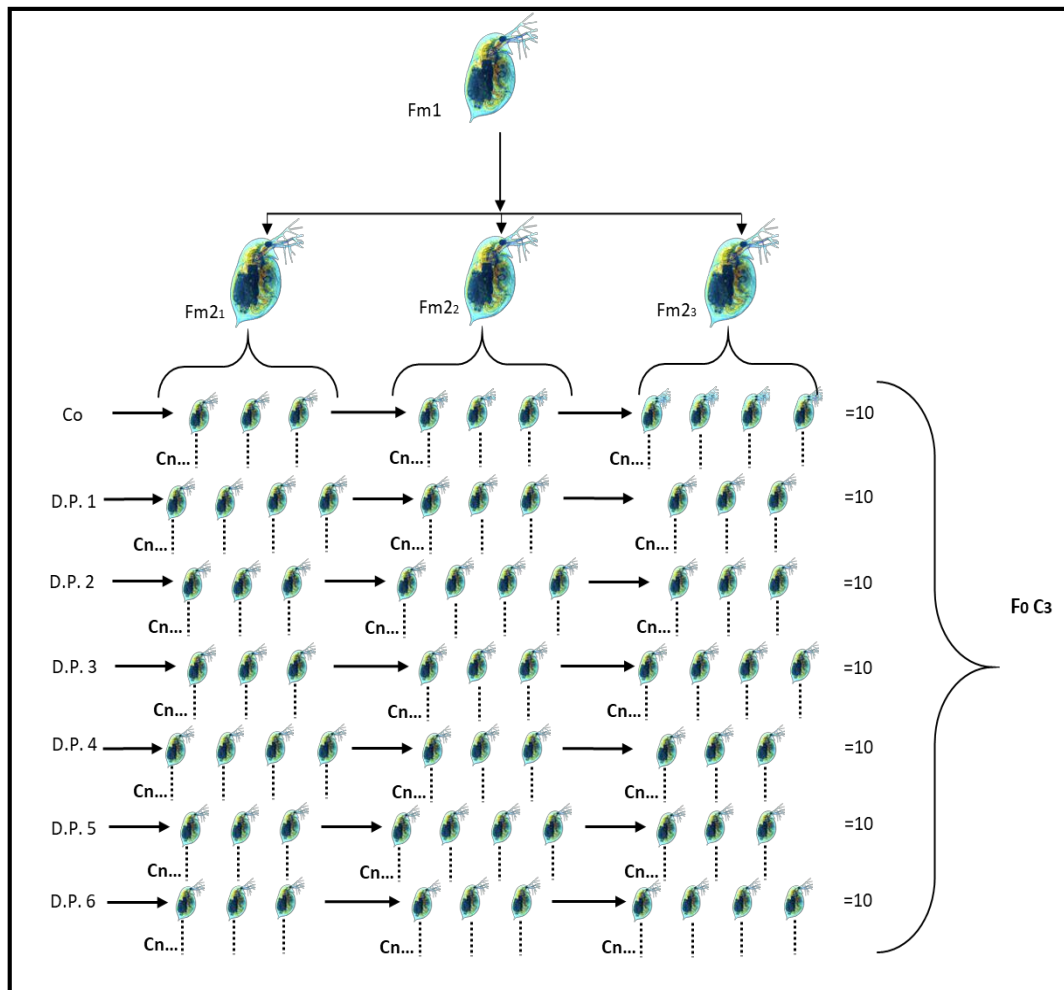


Figura 8. Resumen del diseño experimental de *Daphnia pulicaria* en tratamientos de Co= control y D.P.= dicromato de potasio en sus diferentes concentraciones. Fm1= madre del clon, Fm2n=primera generación de madres complementarias, F<sub>0</sub>C<sub>3</sub>=Individuos experimentales de exposición aguda o generación 0 camada 3 de las madres Fm2n, Cn= Camadas subsiguientes de una misma hembra.

A cada individuo de la F<sub>0</sub> se le siguió de forma individual hasta la muerte, se contabilizó su sobrevivencia a las 24 y 48 horas, la edad a la primera madurez, número de crías en la primera camada, número de crías promedio por camada, el número de camadas totales, número de crías

totales y la longevidad en días. Estas variables permitieron evaluar los efectos toxicológicos al compararlas entre los tratamientos, con un análisis de varianza de un factor con siete niveles (control y Dicromato de potasio en sus 6 concentraciones) para cada una de las variables.

### **8.6. Solución patrón de dicromato de potasio**

De acuerdo a lo descrito en la NMX-AA-087-SCFI-2010 (SE, 2010), la solución patrón se preparó de la siguiente manera:

Se pesaron 50 mg de  $K_2Cr_2O_7$  aforados a 100mL con agua desionizada. Una vez preparada la disolución madre, se conservó en oscuridad y refrigeración a  $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$  hasta por doce meses.

A partir de esta disolución madre, se elaboró tanto la serie de concentraciones o diluciones necesarias para el cálculo de la  $CE_{50}$  del tóxico de referencia para un tiempo de exposición de 24 y 48 h, así como la concentración de la dilución que se utilizó como control positivo.

El ámbito de respuesta aceptable de la  $CE_{50}$  para el dicromato de potasio a las 48 h fue de entre 0,6 mg/L a 2,1 mg/L, lo cual fue equivalente a 0,21 mg/L y 0,74 mg/L como cromo hexavalente, respectivamente.

En cualquier caso, los reactivos tuvieron una pureza mínima del 99,95%.

## **8.7. Análisis Estadístico**

Se realizó un análisis de varianza de un factor con seis niveles (control y dicromato de potasio en sus cinco concentraciones) para cada una de las ocho variables. La comparación de la sobrevivencia a las 24 y 48 horas y la longevidad de *Daphnia pulicaria* con respecto a la concentración de dicromato de potasio se realizó con un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, debido a que éstas variables son discontinuas y no se ajustan a una distribución normal.

En el mismo caso, la comparación de la edad a la primera reproducción, número de crías en la primer camada, número de crías totales, número de camadas y número de crías promedio por camada de *Daphnia pulicaria*, con respecto a la concentración de dicromato de potasio se realizó con un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis.

## **9. Resultados**

El objetivo del trabajo fue evaluar los efectos toxicológicos en las variables de crecimiento, reproducción y sobrevivencia en *Daphnia pulicaria*, por la exposición aguda a dicromato de potasio a las concentraciones de 0.6 mg/l, 1.05 mg/l, 2.1 mg/l, 3.15 mg/l y 4.2 mg/l para evaluar sobrevivencia, reproducción y longevidad se especificará en su caso cuales concentraciones se tomaron en cuenta del tóxico de referencia utilizado en la NMX-AA-087-SCFI-2010. A continuación se describen los resultados por variable.

### **9.1 Sobrevivencia**

En el experimento de sobrevivencia de *Daphnia pulicaria* a las 24 horas de exposición aguda a dicromato de potasio (figura 9), es evidente que al incrementarse la concentración del dicromato de potasio, disminuye la sobrevivencia de *Daphnia pulicaria*. También se determinó que la sensibilidad (sobrevivencia sub-letal) de ésta especie al tóxico de referencia se encuentra entre 0.5 y 3.1 mg/l (n=20). Donde la concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) es de 2.3 mg/l.

Es evidente que en concentraciones menores a 0.5 mg/l de éste compuesto químico no produce la muerte de ningún individuo (n=30), y en concentraciones iguales o superiores a 3.1 mg/l aniquilan al total de la población (n=20).

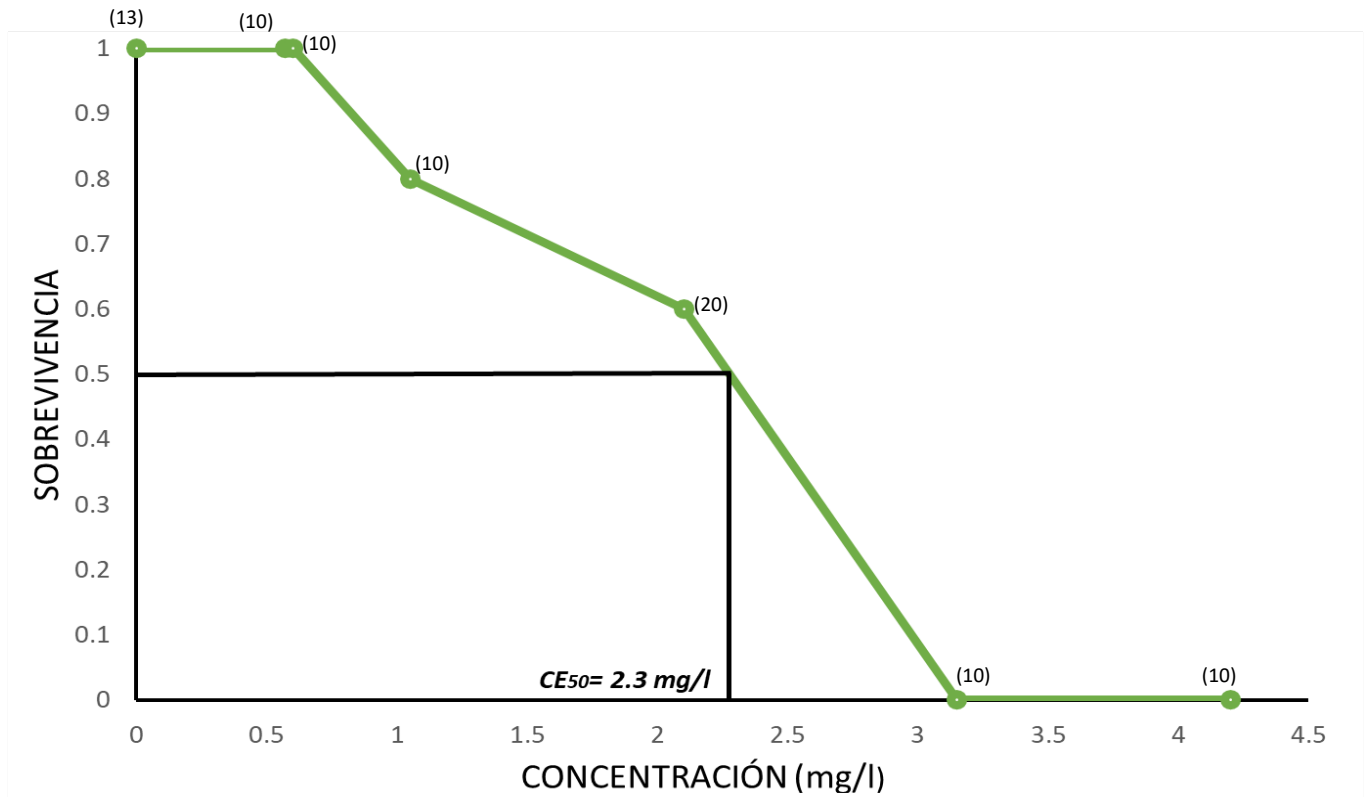


Figura 9. Curva de la proporción de sobrevivientes, donde se resalta la  $CE_{50}$  a las 24 horas de exposición de *Daphnia pulex* expuesto a diferentes concentraciones de dicromato de potasio. Entre paréntesis está el número de réplicas en contenedores individuales.

De manera similar, a las 48 horas de exposición aguda a dicromato de potasio (Figura 10), se mantuvieron los mismos sobrevivientes confirmando los resultados a las 24 horas de ésta especie, donde la sensibilidad al compuesto de estudio, se encuentra entre 0.5 y 3.1 mg/l ( $n=20$ ). Con una concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) de 2.3 mg/l.

Lo anterior, confirmó que los resultados a las 24 horas, son idénticos a las 48 horas, por lo que no hay que esperar 48 horas para evaluar la supervivencia y determinar la  $CE_{50}$ .



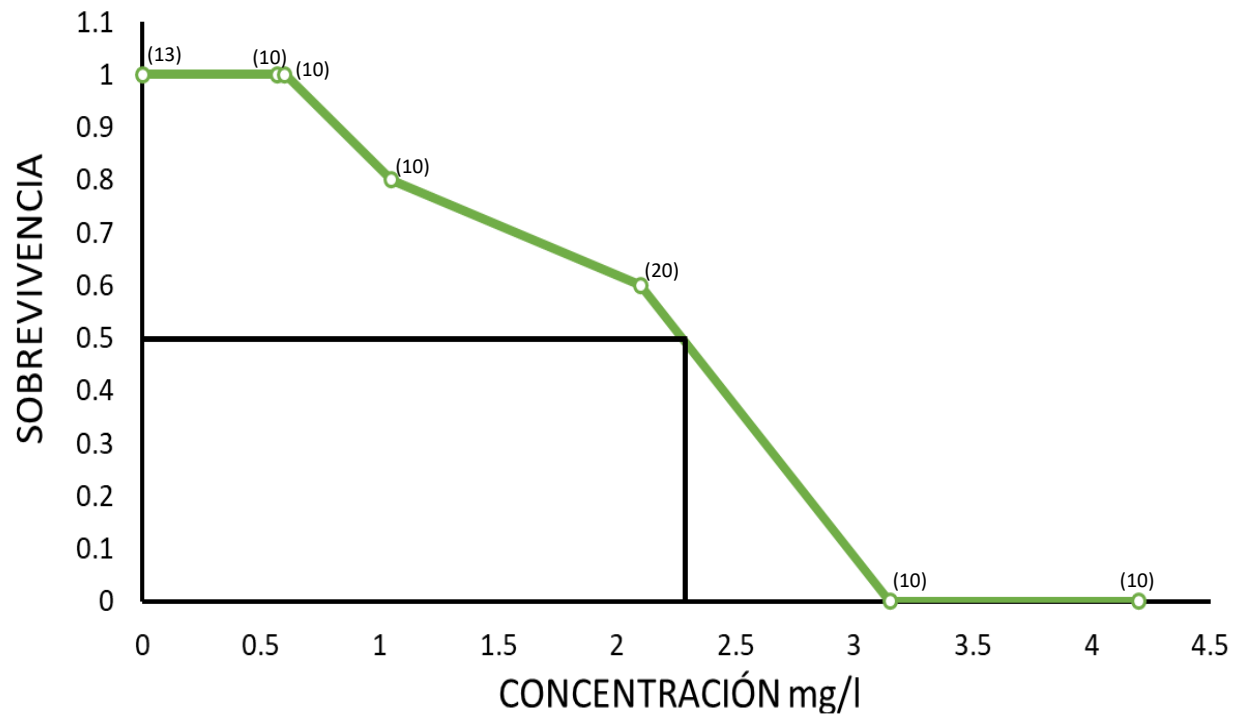


Figura 10. Curva de la proporción de sobrevivientes, donde se resalta la CE50 a las 48 horas de exposición de *Daphnia pulex* expuesto a diferentes concentraciones de dicromato de potasio. Entre paréntesis está el número de réplicas en contenedores individuales.

## 9.2. Reproducción

### 9.2.1. Edad a la primera madurez

En cuanto a la edad a la primera madurez en *Daphnia pulex*, de igual manera, se evaluó en el grupo control y en las concentraciones de 0.6 y 2.1 mg/l del tóxico de referencia, que fue donde hubo individuos sobrevivientes y que pudieron llegar a la edad a la primera madurez de los cuales se pudieron obtener resultados para ésta variable. Los valores se aprecian en la figura 11 y se describen de la siguiente manera:

Para los individuos control (0 mg/l), se tuvo una edad a la primera madurez promedio de 10 días (9-11). Comparado con los resultados de las diferentes concentraciones de dicromato de potasio, existen diferencias significativas por efecto de la concentración ( $H=23.49$ ,  $n_0=13$ ,  $n_{0.6}=10$ ,  $n_{2.1}=6$  y  $p<0.0001$ ), en la figura 11 se observa que la edad a la primera madurez aumenta con la concentración, dichos resultados se encuentran entre los siguientes valores:

En la concentración de 0.6 mg/l, la edad a la primera madurez fue en promedio de 13 días (11-14), en 2.1 mg/l fue de 17 días (15-22) y en 3.15 y 4.2 mg/l ya no se pudo obtener el valor promedio ya que los individuos expuestos a estas concentraciones murieron antes de llegar a la edad de la primera madurez.

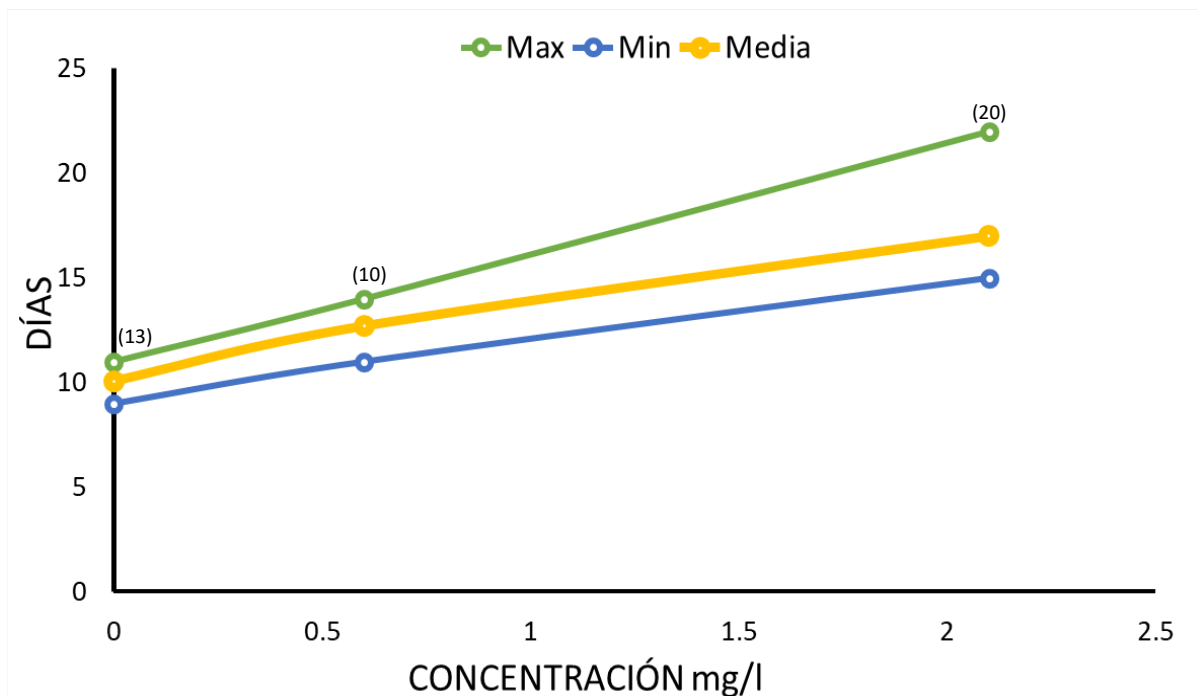


Figura 11. Curva de media, máximos y mínimos suavizadas de la edad a la primera madurez de *Daphnia pulicaria*, para comparar el efecto de la concentración de dicromato de potasio. Entre paréntesis está el número de réplicas en contenedores individuales.

### 9.2.2. Número de crías en la primera camada

En cuanto al número de crías en la primera camada de *Daphnia pulicaria*, se evaluó de la misma manera en el grupo control y en las mismas concentraciones de 0.6 y 2.1 mg/l del tóxico de referencia, que fue donde hubo individuos sobrevivientes y que pudieron llegar al primer evento reproductivo de los cuales se pudieron obtener resultados para ésta variable. Los valores se aprecian en la figura 12 y se describen de la siguiente manera:

Para los individuos control (0 mg/l), se tuvo un número de crías en la primera camada promedio de 12 neonatos por camada (11-14). Comparado con los resultados de las diferentes concentraciones de dicromato de potasio, podemos ver que existen diferencias significativas por el efecto de la concentración ( $H=20.87$ ,  $n_0=13$ ,  $n_{0.6}=10$ ,  $n_{2.1}=6$  y  $p<0.0001$ ), en la figura 12 se observa que el número de crías en la primera camada disminuye conforme aumenta la concentración, dichos resultados se encuentran entre los siguientes valores:

En la concentración de 0.6 mg/l, el número de crías en la primera camada fue en promedio de 4 días (2-7), en 2.1 mg/l fue de 3 días (1-5) y en 3.15 y 4.2 mg/l ya no se pudo obtener el valor promedio ya que los individuos expuestos a estas concentraciones murieron antes de poder tener su primera camada.

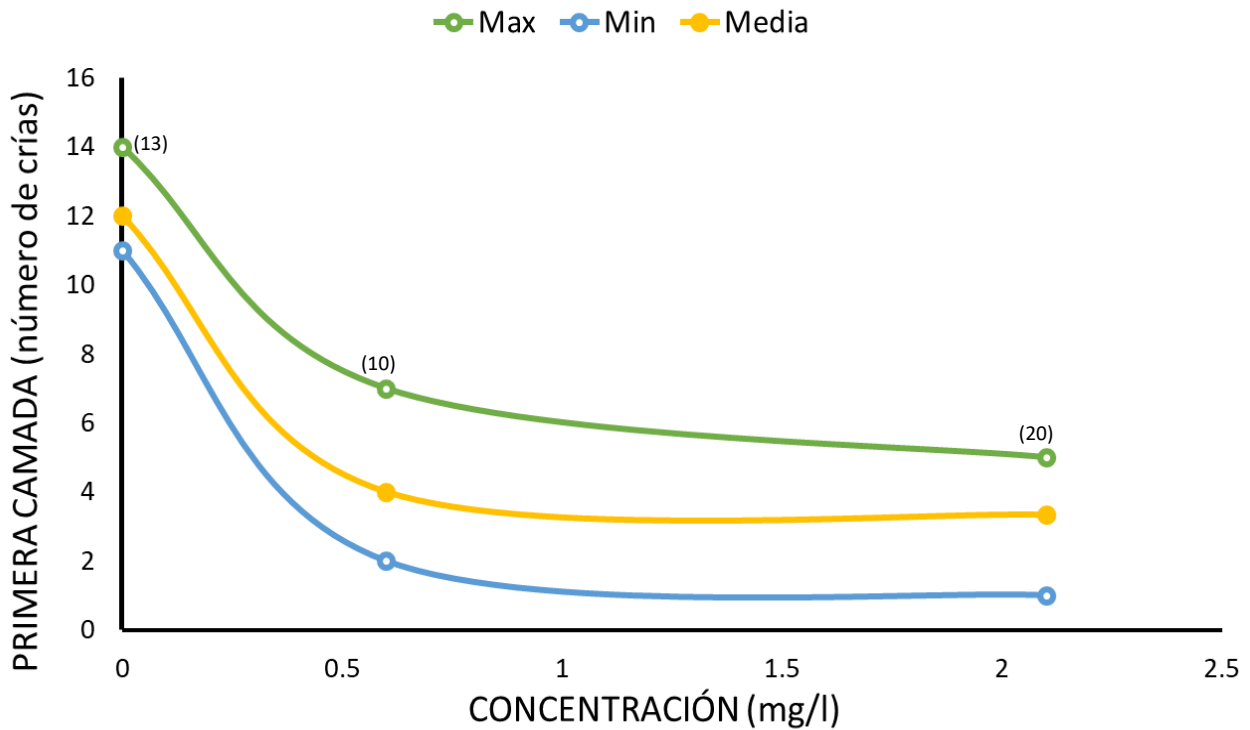


Figura 12. Curva de media, máximos y mínimos suavizadas del número de crías en la primera camada de *Daphnia pulicaria*, para comparar el efecto de la concentración de dicromato de potasio. Entre paréntesis está el número de réplicas en contenedores individuales.

### 9.2.3 Número de crías totales

En cuanto al número de crías totales obtenido de *Daphnia pulicaria*, se evaluó de igual manera al grupo control y en las mismas concentraciones de 0.6 y 2.1 mg/l del tóxico de referencia, que fue donde hubo individuos sobrevivientes y donde se pudieron obtener resultados para ésta variable. Los valores se aprecian en la figura 13 y se describen de la siguiente manera:

Para los individuos control (0 mg/l), se tuvo un número promedio de crías totales de 295 (279-307) por madre. Comparado con los resultados de las diferentes concentraciones de dicromato de potasio, podemos ver que

existen diferencias significativas por el efecto de la concentración ( $H=22.58$ ,  $n_0=13$ ,  $n_{0.6}=10$ ,  $n_{2.1}=6$  y  $p<0.0001$ ), en la figura 13 se observa que el número de crías totales disminuye conforme aumenta la concentración, dichos resultados se encuentran entre los siguientes valores:

En la concentración de 0.6 mg/l, el número de crías totales fue de 52 crías (2-91), en 2.1 mg/l fue de 36 crías (26-44) y en 3.15 y 4.2 mg/l ya no se pudo obtener el valor promedio ya que los individuos expuestos a estas concentraciones murieron antes de que pudieran tener crías para evaluar esta variable.

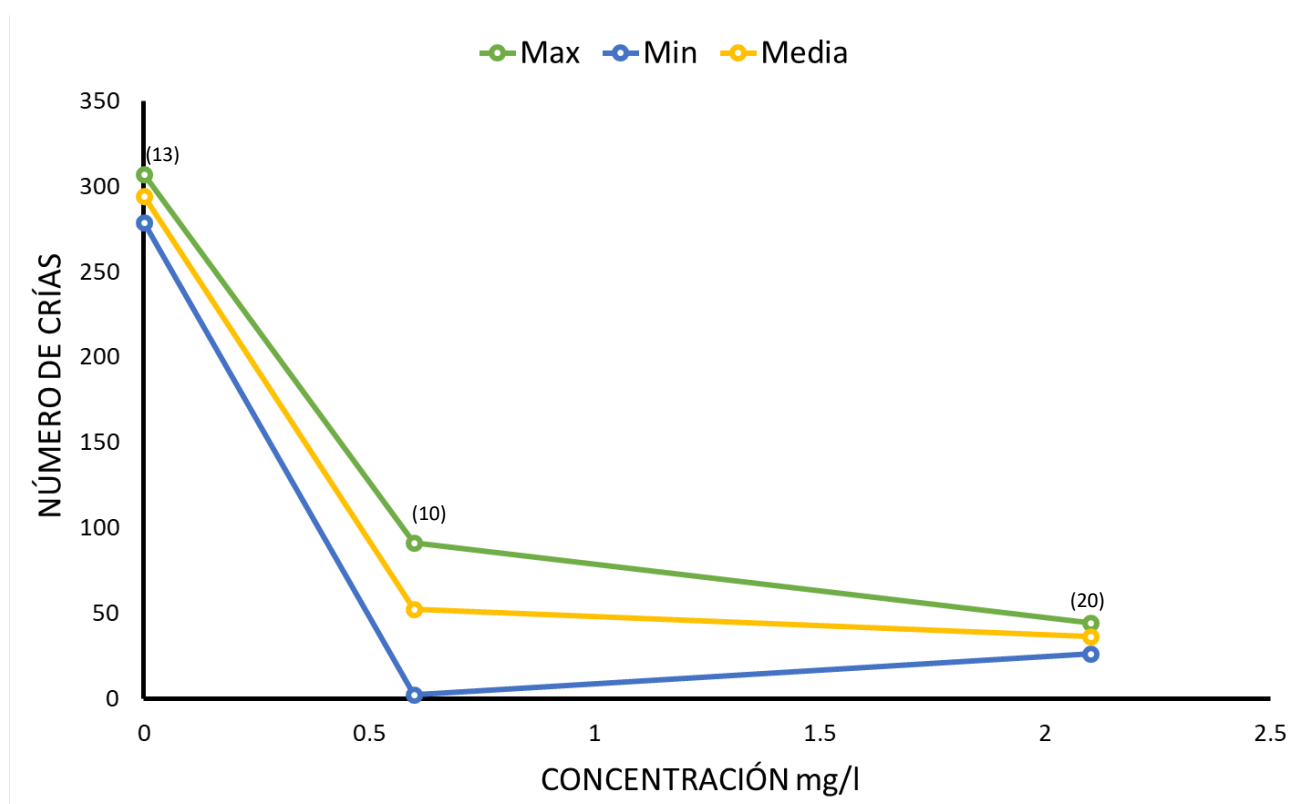


Figura 13. Curva de media, máximos y mínimos suavizadas del número de crías totales de *Daphnia pulicaria*, para comparar el efecto de la concentración de dicromato de potasio. Entre paréntesis está el número de réplicas en contenedores individuales.

#### 9.2.4. Número de camadas totales

En cuanto al número de camadas totales obtenido de *Daphnia pulicaria*, se evaluó al grupo control y usando las mismas concentraciones de 0.6 y 2.1 mg/l del tóxico de referencia, que fue donde hubo individuos sobrevivientes y donde se pudieron obtener resultados para ésta variable. Los valores se aprecian en la figura 14 y se describen de la siguiente manera:

Para los individuos control (0 mg/l), se tuvo un número promedio de camadas totales de 10 camadas (10-11). Comparado con los resultados de las diferentes concentraciones de dicromato de potasio, podemos ver que existen diferencias significativas por el efecto de la concentración ( $H=22.42$ ,  $n_0=13$ ,  $n_{0.6}=10$ ,  $n_{2.1}=6$  y  $p<0.0001$ ), en la figura 14 se observa que el número de camadas totales disminuye conforme aumenta la concentración, dichos resultados se encuentran entre los siguientes valores:

En la concentración de 0.6 mg/l, el número de camadas totales fue en promedio de 6 eventos reproductivos (1-7), en 2.1 mg/l fue de 4 eventos reproductivos (3-5) y en 3.15 y 4.2 mg/l ya no se pudo obtener el valor promedio ya que los individuos expuestos a estas concentraciones murieron antes de que pudieran tener camadas para evaluar esta variable.

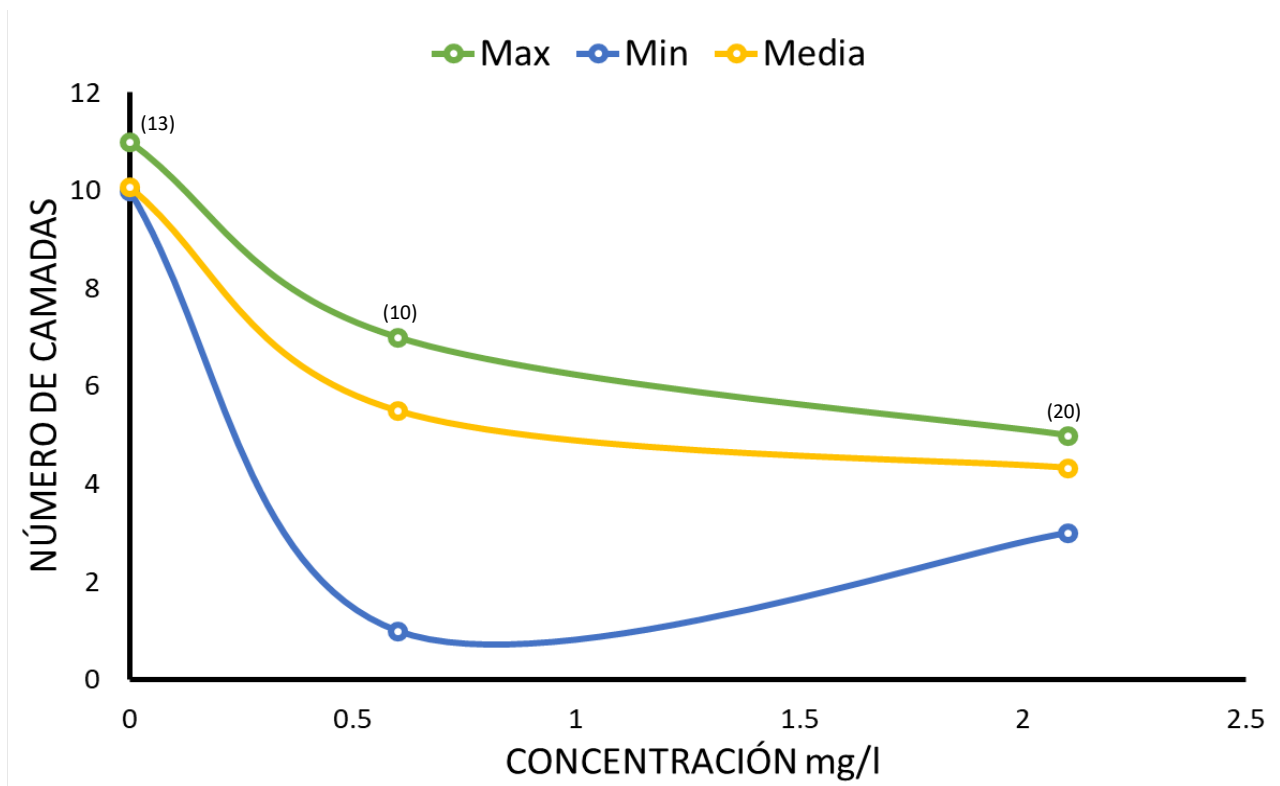


Figura 14. Curva de media, máximos y mínimos suavizadas del número de camadas totales de *Daphnia pulicaria*, para comparar el efecto de la concentración de dicromato de potasio. Entre paréntesis está el número de réplicas en contenedores individuales.

### 9.3. Longevidad

En cuanto a la longevidad en *Daphnia pulicaria* solo se evaluó en el grupo control y en las concentraciones de 0.6, 2.1, 3.15 y 4.2 mg/l de dicromato de potasio, que fue donde hubo individuos sobrevivientes. Los valores se aprecian en la figura 15 y se describen de la siguiente manera:

Para los individuos control, se tuvo una longevidad promedio en *Daphnia pulicaria* de 57 días (56-58). Comparado con los resultados de las diferentes concentraciones de dicromato de potasio, con el grupo control (0 mg/l), existen diferencias significativas por efecto de la concentración ( $H=46.53$ ,  $n_0=13$ ,  $n_{0.6}=10$ ,  $n_{2.1}=12$  y  $p<0.0001$ ), en la figura 15 se observa

que la longevidad disminuye con la concentración, y dichos resultados se encuentran entre los siguientes valores:

En la concentración de 0.6 mg/l, hubo una longevidad promedio de 48 días (28-56), 2.1 mg/l una longevidad promedio de 17 días (4-54), 3.15 mg/l con una longevidad de 1 día, al igual que a 4.2 mg/l con una longevidad de 1 día.

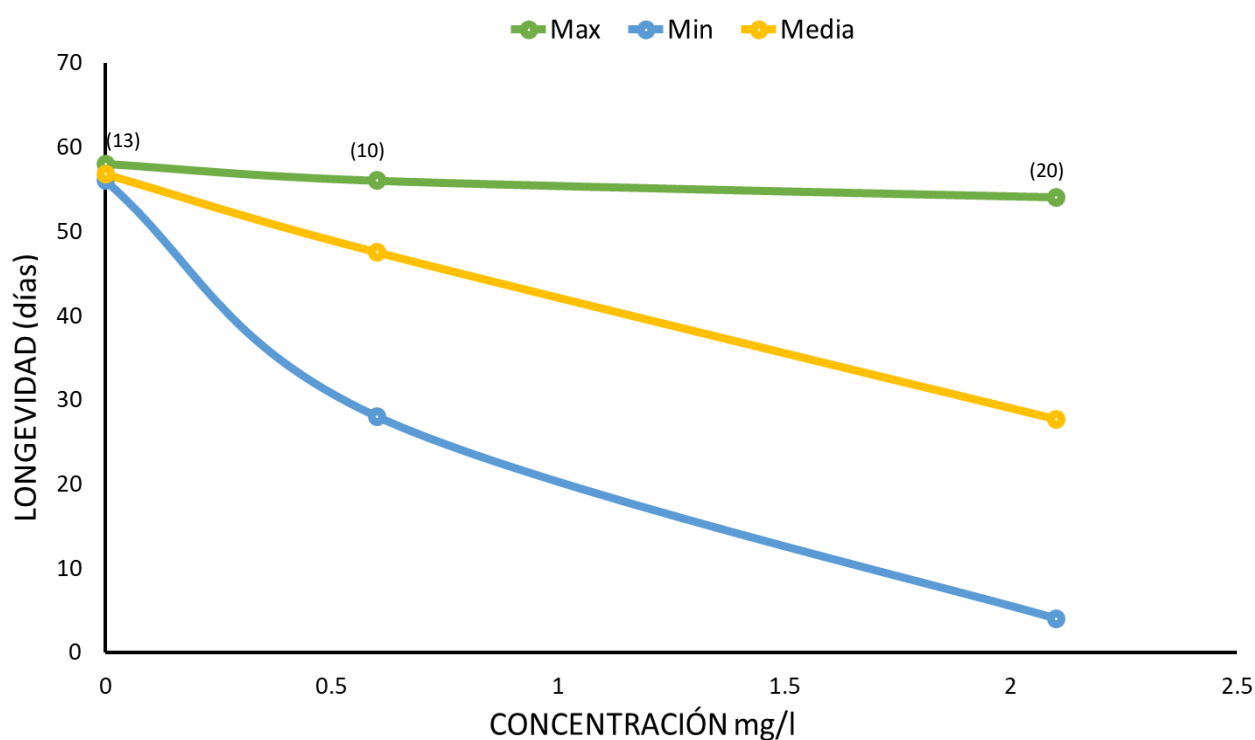


Figura 15. Curva de media, máximos y mínimos suavizadas de la longevidad de *Daphnia pulicaria*, para comparar el efecto de la concentración de dicromato de potasio. Entre paréntesis está el número de réplicas en contenedores individuales.



## **10. Discusión**

### **10.1 Sobrevivencia**

La sobrevivencia de *Daphnia pulicaria* mostró sensibilidad, ya que al incrementarse la concentración de dicromato de potasio, disminuye la sobrevivencia a las 24 y 48 horas de *Daphnia pulicaria*, hasta 3.15 mg/l y concentraciones superiores donde se muere el 100% de la población.

De igual manera la sobrevivencia de *Daphnia pulicaria* se ha mostrado sensible en experimentos de radiación ionizante con un láser de baja energía además de presentar variación morfológica, apoyando la propuesta de que efectivamente es una especie adecuada para el monitoreo toxicológico (Zaldivar-Ortiz, 2018 y Zaldivar-Ortiz *et al* 2018).

Las pruebas de sobrevivencia de *Daphnia pulicaria* a las 24 y 48 horas de exposición al dicromato de potasio, muestra que esta variable es un indicador biológico suficientemente sensible para la evaluación de compuestos químicos.

#### *10.1.1. CE<sub>50</sub>*

Comparando los valores de CE<sub>50</sub> de *Daphnia magna* (Kuhn *et al.*, 1989) con *Daphnia pulicaria* de este trabajo, ambas expuestas a de forma aguda (24 y 48 horas) a dicromato de potasio en experimentos bajo las mismas condiciones pero en diferentes laboratorios, se aprecia que *Daphnia pulicaria* tiene un valor de CE<sub>50</sub> de 2.3 mg/l que es mayor que el de *Daphnia magna*, que se determinó en 0.35 mg/l. Es difícil determinar porque *Daphnia pulicaria* es más tolerante que *Daphnia magna*, ya que

se trata de 2 especies diferentes, pero podemos suponer que es debido a la biología de cada una.

En otro experimento con *Daphnia magna* y dicromato de potasio, bajo las mismas condiciones de cultivo la CE<sub>50</sub> (48 h) del dicromato de potasio se determinó en un intervalo entre 0.61 a 0.68 mg/l (Gopi *et al*, 2012).

Esto se puede interpretar como una mayor tolerancia de *Daphnia pulicaria* al dicromato de potasio. Esta característica de mayor resistencia al tóxico de referencia de *Daphnia pulicaria* permitió realizar las pruebas de sobrevivencia y reproducción, experimento que en otros trabajos no se realizaron y para los cuales no se encontraron en la literatura datos de comparación, por lo que se consideran datos nuevos para este cladóceros.

Desde la perspectiva ecológica y económica, a pesar de su mayor tolerancia al dicromato de potasio, utilizar a *Daphnia pulicaria* tiene beneficios ya que es un organismo de alta montaña que se distribuye en los cuerpos de agua del Alto Lerma en donde ha evolucionado bajo las presiones ambientales naturales que en ésta zona ocurren (Elías *et al.*, 2008), lo que facilita su cultivo ya que está expuesto de manera natural a la contaminación y lo hacen un modelo adecuado para ésta zona.

Otros experimentos realizados con *Daphnia pulicaria* han sido con cipermetrina, se ha demostrado que la CE<sub>50</sub>, en este químico, es a la concentración de 2 ng L<sup>-1</sup>, donde aparenta una mayor sensibilidad para éste toxón (Viveros-Sánchez, 2020).

## 10.2 Reproducción

El dicromato de potasio disminuye de forma general la reproducción de *Daphnia pulicaria*, generando un porcentaje de inhibición del 92 al 100% de producción de crías totales. De igual manera, para *Daphnia magna*, se ha mostrado disminución en la reproducción por dicromato de potasio (Gopi *et al* 2012), donde el porcentaje más alto de inhibición de la tasa de reproducción (75,87%) se registró en la concentración del elemento de prueba de 0,4 mg / L, mientras que el porcentaje más bajo de inhibición del 17,66% se registró en 0,03 mg/L.

Cabe mencionar que dentro de los efectos tóxicos se encuentran respuestas al compuesto químico a partir de la exposición aguda del organismo a la sustancia tóxica (sobrevivencia), y respuestas del organismo a la exposición, donde en este caso, la respuesta del organismo al químico resulta en efectos inhibitorios de procesos biológicos como son la sobrevivencia y la longevidad (Roldán Reyes, E. 2016).

### 10.2.1. Edad a la primera madurez

El dicromato de potasio retrasa el inicio de la madurez sexual de *Daphnia pulicaria*; dentro del intervalo de 0.6 a 2.1 mg/l de dicromato de potasio, al igual que en el experimento realizado por Gopi (2012) con *Daphnia magna* y exponiéndola a dicromato de potasio, donde el primer evento reproductivo se registró a los 9 días de edad en el control, 0,03 y 0,05 mg/L, mientras esta se retrasó hasta el día 12 en las concentraciones del dicromato de potasio de 0,1, 0,2 y 0,4 mg/L.

En otro trabajo se muestran resultados específicos para *Daphnia pulicaria* (Zaldivar-Ortiz, 2018 y Zaldivar-Ortiz *et al* 2018), donde se

determinó la primera camada a los 15 días después de nacer y la radiación con un láser de baja energía no presentó un efecto significativo sobre esta variable.

#### 10.2.2. Número de crías en la primera camada

En cuanto a ésta variable, no se encontraron trabajos previos en la literatura que reporten datos con *Daphnia pulicaria* o *Daphnia magna*, pero es recomendable medirlos para evaluar los efectos subletales, ya que, a veces los individuos no sobreviven más allá del primer evento reproductivo.

#### 10.2.3. Número de crías totales

El dicromato de potasio disminuye el número de crías totales de *Daphnia pulicaria*; dentro del intervalo de 0.6 a 2.1 mg/l de dicromato de potasio, este es un efecto similar a lo que encontró (Zaldivar-Ortiz, 2018 y Zaldivar-Ortiz *et al* 2018), donde al evaluar el número total de crías afectadas por la radiación de un láser de baja energía, estas disminuyeron significativamente. Al igual que Viveros-Sánchez (2020) donde la exposición de *Daphnia pulicaria* a cipermetrina, hace que el número de crías totales también disminuyó de manera significativa.

En el experimento de Gopi *et al* (2012) con *Daphnia magna* también disminuyó el número de crías totales por el efecto de dicromato de potasio. En *Daphnia pulicaria* también se observó la disminución significativa de esta variable, por el efecto de dicromato de potasio. Es importante remarcar que *Daphnia pulicaria* es 2 veces más prolífica que *Daphnia magna*, esto puede ser una ventaja para medir variables de reproducción.

#### 10.2.4. Número de camadas totales

El dicromato de potasio disminuye el número de camadas totales de *Daphnia pulicaria*; dentro del intervalo de 0.6 a 2.1 mg/l de dicromato de potasio, a diferencia de la cipermetrina, donde este compuesto plaguicida inhibe completamente la reproducción (Viveros-Sánchez, 2020).

Esta variable presenta 2 efectos contrastantes relacionados al toxón, por un lado una disminución gradual de camadas totales en relación con el incremento de la concentración de dicromato de potasio, y por otro lado, una inhibición total por el efecto de la cipermetrina sin importar la concentración (Viveros-Sánchez, 2020).

### 10.3 Longevidad

El dicromato de potasio disminuye la longevidad de *Daphnia pulicaria*; dentro del intervalo de 0.6 a 2.1 mg/l de dicromato de potasio, los únicos reportes de longevidad para *Daphnia pulicaria* sin ser expuesta a ningún tóxico son los de (Zaldivar-Ortiz, 2018 y Zaldivar-Ortiz *et al* 2018) y Viveros-Sánchez (2020).

En el trabajo de (Zaldivar-Ortiz, 2018 y Zaldivar-Ortiz *et al* 2018), se determinó que la longevidad fue de 41 a 43 días y el de Viveros-Sánchez (2020) fue de 47 días, comparando con la longevidad en días determinada en éste trabajo, que fue de 56 a 58, se aprecia que la longevidad es una característica muy variable para ésta especie y que así como presento sensibilidad para la radiación ionizante y la cipermetrina respectivamente, también es muy sensible para dicromato de potasio.

## 11. Conclusiones

Al igual que *Daphnia magna*, que es la que se considera referente para la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010 (SE, 2010), *Daphnia pulicaria* es una opción como modelo toxicológico óptimo para ésta altitud, debido a las características que se mencionan a continuación, que la hacen sensible al dicromato de potasio, que es el tóxico de referencia; además de que es un individuo que se puede encontrar de forma natural en los cuerpos de agua del Alto Lerma, y está adaptado a la altitud de ésta región (2600 msnm considerado alta montaña) donde no ha sido posible cultivar *Daphnia magna* con éxito, por lo tanto es una especie de fácil cultivo en el laboratorio, lo que permite realizar pruebas rápidas y económicas, por lo tanto, podemos determinar que *Daphnia pulicaria* si no es un mejor modelo toxicológico para realizar pruebas en ésta región, sí es un modelo confiable.

- Al incrementarse la concentración de dicromato de potasio, disminuye la sobrevivencia a las 24 y 48 horas de *Daphnia pulicaria*, hasta 3.15 mg/l y concentraciones superiores donde se muere el 100% de la población.
- La concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) fue de 2.3 mg/l.
- El dicromato de potasio disminuye la reproducción de *Daphnia pulicaria*; dentro del intervalo de 0.6 a 2.1 mg/l de dicromato de potasio.
- El dicromato de potasio retrasa el inicio de la madurez sexual de *Daphnia pulicaria*; dentro del intervalo de 0.6 a 2.1 mg/l de dicromato de potasio.

- El dicromato de potasio disminuye el número de crías en la primera camada de *Daphnia pulicaria*; dentro del intervalo de 0.6 a 2.1 mg/l de dicromato de potasio.
- El dicromato de potasio disminuye el número de crías totales de *Daphnia pulicaria*; dentro del intervalo de 0.6 a 2.1 mg/l de dicromato de potasio.
- El dicromato de potasio disminuye el número de camadas totales de *Daphnia pulicaria*; dentro del intervalo de 0.6 a 2.1 mg/l de dicromato de potasio.
- El dicromato de potasio disminuye la longevidad de *Daphnia pulicaria*; dentro del intervalo de 0.6 a 2.1 mg/l de dicromato de potasio.

## 12. Referencias de consulta.

- Andrewartha, S. and Burggren, W. (2012). Transgenerational Variation in Metabolism and Life-History Traits Induced by Maternal Hypoxia in *Daphnia magna*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 85 (6): 625-634
- Asselman, J., De Coninck, D., Vandegheuchte, J., Jansen, M., Decaestecker, E., Meester, L., VandenBussche, J., Vanhaecke, L., Janssen, C. & Schamphelaere, K. (2015). Global Cytosine Methylation In *Daphnia magna* Depends On Genotype, Environment, And Their Interaction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34: 1056-1061.
- Bonasio, R. (2015). The expanding epigenetic landscape of non-model organisms. *The Journal of Experimental Biology*. 218:114-122
- Burggren, W. (2015). Dynamics of epigenetic phenomena: intergenerational and intragenerational phenotype 'washout'. *The Journal of Experimental Biology*. 218: 80-87.
- Carotenuto, Y., Wichard, T., Pohnert, G. and Lampert, W. (2005). Life-history responses of *Daphnia pulicaria* to diets containing freshwater diatoms: Effects of nutritional quality versus polyunsaturated aldehydes. *Limnology and Oceanography*, 50(2): 449-454.
- Cervantes, A., Gutierrez-Martínez M., Delgado, V., Ruíz, J. (2012). Especies de zooplancton dulceacuícola de Cozumel. De Universidad de Quintana Roo. 62p
- Ebert, D. (2005). Ecology, Epidemiology and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. *The National Center for Biotechnology*



Information. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>.

- Elías-Gutiérrez, M. & M. E. Valdéz-Moreno. (2008). A new cryptic species of *Leberis* Smirnov, 1989 (Crustacea, Cladocera, Chydoridae) from the Mexican semi-desert region, highlighted by DNA barcoding. *Hidrobiológica*, 18: 63-74.
- Elías-Gutierrez, M., Nieto G. y Garfias-Espejo, T. (2004). Pulgas de Agua: Pequeños Monstruos Dulceacuícolas. *Ciencia y Desarrollo* 174:17-21
- Forró, L., N.M. Korovchinsky, A.A.Kotov, & A. Petrusek, A. (2008). Global diversity of cladocerans (Cladocera, Crustacea). *Hydrobiologia* 595: 177-184.
- Gutierrez, E., Silva, M., Granados, J. y Garfias, T. (2008). Cladóceras y Copepoda de las Aguas Continentales de México. UNAM. México DF. 322p
- Gliwicz, Z. and Boavida, M. (1996). Clutch size and body size at first reproduction in *Daphnia pulicaria* at different levels of food and predation. *Journal of Plankton Research*.18 (6):863-880
- Gopi, R. A., Ayyappan, S., Chandrasehar, G., Krishna Varma, K. y Goparaju, A. (2012). Effect of Potassium Dichromate on the Survival and Reproduction of *Daphnia magna*. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. 1(7):89-94.
- Gottardi, M., Birch, M., Dalhoff, K. and Cedergreen, N. (2017). The effects of epoxiconazole and  $\alpha$ -cypermethrin on *Daphnia magna* growth, reproduction, and offspring size. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 36(8):2155–2166.
- Harris, K., Bartlett, N. and Lloyd, V. (2012). *Daphnia* as an Emerging Epigenetic Model Organism. *Genetics Research International*. Volume 2012, Article ID 147892, 8 pp.

- International Organization for Standardization (ISO) (2007). 10706:2000, Water quality - Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). ISO TC 147/SC 5/WG 2. 24 pp.
- Kuhn, R., Pattard, M., Pernak, K-D. y Winter, A. (1989). Results of the harmful effects of selected water pollutants (Anilines, phenols, aliphatic compounds) to *Daphnia magna*. *Water Research*, vol. 23, p. 495-499.
- Lanteri, A., Confalonieri, V. y Rodriguero, M. (2010). Formas curiosas de reproducción animal. La partenogénesis. *Ciencia Hoy*. 20 (119): 15-22
- Maderey, L. y Jiménez, A. (2001). Alteración del ciclo hidrológico en la parte baja de la cuenca alta del río Lerma por la transferencia de agua a la Ciudad de México. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM*. 45, pp. 24-38.
- Martínez, F., Villaseñor, R., Espinosa, F., Ríos, G. y Ramírez, R. (1997). Metodología para la producción de neonatos de *Daphnia magna* (Anomopoda: Daphnidae), como organismo de prueba en toxicología acuática. *Zoología Informa*. Nums 36-37: 59-81.
- Martínez-Jerónimo, F., Rodríguez-Estrada, J. y 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.
- Martínez-Jerónimo, F. (2008). Ensayo de toxicidad aguda con cladóceros de la familia *Daphnidae*. En: Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo.

Compiladores Ramírez P. y Mendoza A. SEMARNAT. México. pp. 99-114

- Núñez, M. (2005), Bioensayos de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. 12(1): 165-170.
- Olijnyk, A. (2011). Genotypic differences and life-history trade-offs in the freshwater zooplankton, *Daphnia pulicaria*, under natural levels of food limitation. Master of Science Thesis. Queen's University. Kingston, Ontario, Canada. 104pp.
- Rand, G. M., Wells, P. G. y McCarty, L. S. (2020). Chapter 1. Introduction to Aquatic Toxicology. *Fundamentals Of Aquatic Toxicology: Effects Environmental Fate And Risk Assessment*.
- Roldán Reyes, E. (2016). Introducción a la toxicología. Universidad Nacional Autónoma de México. 141pp
- Secretaría de Economía (SC). 2010. NMX-AA-087-SCFI-2010. NORMA MEXICANA. ANÁLISIS DE AGUA - EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA CON *Daphnia magna*, Straus (Crustacea - Cladocera) - MÉTODO DE PRUEBA. México. 44 pp.
- U S Environmental Protection Agency. (2013). Procedures for Conducting *Daphnia magna*. Toxicity Bioassays User's Guide. 70 pp.
- Vargas-Bernal, J. y Ramírez-Forero, M. (1993). Boletín científico. De Universidad de California. Editor El Instituto, 1993. Colaborador Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (Colombia). Volúmenes 1-4
- Viveros-Sánchez, I., (2020). Evaluación de la Disminución Toxicológica de la Cipermetrina en Agua Tratada por el Reactor Cavoxd utilizando a *Daphnia Pulicaria* como Monitor Biológico.

Tesis Profesional de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. 63pp.

- Zaldivar-Ortiz, F., (2018). Estudio In Vitro de la Sobrevivencia, Reproducción y Morfología de Daphnia Pulicaria Irradiada con un Láser de Baja Energía. Tesis Profesional de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. 50pp.
- Zaldivar-Ortiz, F., Montoyal J., González S., Mandujano, L. A., Méndez-Sánchez, J. F., Romero, L., Mulia, J., Paulin, M. y Osorio-González, D., (2018). In vitro Study of the Survival, Reproduction and Morphology of Daphnia pulicaria irradiated with a Low Energy Laser. *Journal of Nuclear Physics, Material Sciences, Radiation and Applications*. 6(1):109–113