



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“DESARROLLO DE *Daphnia* sp. COMO BIOINDICADOR DE  
ARSÉNICO, CADMIO Y PLOMO EN AGUA”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO QUÍMICO AMBIENTAL**

PRESENTA

**LINA GUERRERO LÓPEZ**

DIRIGIDA POR

**Dr. MIGUEL ÁNGEL RICO RODRÍGUEZ**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2018.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA

"DESARROLLO DE *Daphnia* sp. COMO  
BIOINDICADOR DE ARSÉNICO, CADMIO Y  
PLOMO EN AGUA"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO QUÍMICO AMBIENTAL

PRESENTA

LINA GUERRERO LÓPEZ

DIRIGIDA POR

Dr. MIGUEL ÁNGEL RICO RODRÍGUEZ

SINODALES

Dr. MIGUEL ÁNGEL RICO RODRÍGUEZ  
DIRECTOR

Dr. MIGUEL ÁNGEL REA LÓPEZ  
SINODAL

Dr. MIGUEL ANGEL RAMOS LÓPEZ  
SINODAL

Dr. JUAN FERNANDO GARCÍA TREJO  
SINODAL

Este trabajo se lo dedico a mis padres y a mi hermano, gracias por todo el apoyo.

¡Los amo!

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis papás, por confiar en mí y darme la oportunidad de tener una licenciatura.

A Diego David, Diego Said y Mitzi, gracias por llenar mi vida de felicidad.

A José Julián, por siempre alentarme a no rendirme y por todo el amor.

A los mejores amigos del laboratorio: Mayelin, Moni, Liz, Hugo, Fer, Aidée y Carlos, gracias por sus ánimos, consejos, ayuda y sobre todo por hacer los días divertidos.

A todos mis profesores en especial al Dr. Rico, por su sabiduría y paciencia, por crear en mí el querer aprender algo nuevo cada día; me llevo muchos conocimientos de cada uno de ustedes. Gracias a mis sinodales: Dr. Ramos, Dr. Rea y Dr. García.

Hago un especial agradecimiento al Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental por haberme permitido realizar mi trabajo de tesis en sus instalaciones.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 La contaminación del agua	1
1.2 Metales y metaloides	1
1.2.1 Arsénico	3
1.2.2 Cadmio	4
1.2.3 Plomo	4
1.3 Ensayos biológicos para determinar toxicidad	5
1.4 <i>Daphnia</i> sp.	7
2. HIPÓTESIS	9
3. OBJETIVOS	10
3.1 Objetivo general	10
3.2 Objetivos específicos	10
4. METODOLOGÍA	11
4.1 Materiales y métodos	11
4.1.1 Cría y mantenimiento de <i>Daphnia</i> sp.	11
4.1.2 Seguimiento del ciclo de vida	13
4.1.3 Bioensayos para determinar toxicidad	13
4.1.4 Análisis de lixiviados de suelos contaminados	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
5.1 Cría y mantenimiento de <i>Daphnia</i> sp.	17
5.2 Seguimiento del ciclo de vida	19
5.3 Bioensayos para determinar toxicidad	22
5.3.1 Bioensayo con arsénico	22
5.3.2 Bioensayo con cadmio	26

5.3.3 Bioensayo con plomo	29
5.4 Análisis de lixiviados de suelos contaminados	31
6. CONCLUSIONES	36
7. REFERENCIAS	37

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Parámetros fisicoquímicos de agua embotellada Aguaq®	12
2	Parámetros fisicoquímicos del agua para la cría de <i>Daphnia</i> sp. en laboratorio	19
3	Ciclo de vida promedio de <i>Daphnia</i> sp. en reproducción partenogenética	22
4	CL <sub>50</sub> y CL <sub>90</sub> a 24 horas de arsénico	26
5	CL <sub>50</sub> y CL <sub>90</sub> a 24 horas de cadmio	28
6	CL <sub>50</sub> y CL <sub>90</sub> a 24 horas de plomo	31
7	Cálculo de la concentración de plomo en el lixiviado a partir del bioensayo con <i>Daphnia</i> sp.	33
8	Análisis de los lixiviados por espectrometría electrotérmica	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Chlorella</i> 400X	12
2	Agitador de 31 rpm	15
3	Morfología de <i>Daphnia</i> sp., vista lateral 30X	20
4	Hembra en reproducción sexual con formación de efipio, marzo 2017, 30X	21
5	Hembra en reproducción asexual partenogenética, abril 2017, 30X	21
6	Dosis – efectos letales de exposición a arsénico en ensayo exploratorio	23
7	Dosis – efectos letales de exposición a arsénico en ensayo definitivo	24
8	Análisis probit para arsénico. Intervalos de confianza al 95%	25
9	Dosis – efectos letales de exposición a cadmio en ensayo exploratorio	26
10	Dosis – efectos letales de exposición a cadmio en ensayo definitivo	27
11	Análisis probit para cadmio. Intervalos de confianza al 95%	27
12	Dosis – efectos letales de exposición a plomo en ensayo exploratorio	29
13	Dosis – efectos letales de exposición a plomo en ensayo definitivo	29
14	Análisis probit para plomo. Intervalos de confianza al 95%	30
15	Bioensayo con lixiviado de suelo contaminado con arsénico	32
16	Bioensayo con lixiviado de suelo contaminado con plomo	33



## RESUMEN

Los metales pesados y metaloides son considerados una de las principales fuentes de contaminación ambiental especialmente en ecosistemas acuáticos. La evaluación basada en bioensayos propone ser un método eficaz que complementa los análisis instrumentales. Dentro del subfilo Crustacea, las especies del género *Daphnia* son utilizadas como organismos en pruebas de toxicidad. El objetivo fue probar a *Daphnia* sp. como bioindicador de contaminación de arsénico, cadmio y plomo en medio acuoso. Para ello se obtuvo *Daphnia* sp. y se cultivó en laboratorio con las siguientes condiciones: fotoperiodo 16:8 luz: oscuridad, temperatura del agua de 23.3°C, pH 7.3, conductividad 1.36 mS cm<sup>-1</sup> y oxígeno disuelto 6.61 mg L<sup>-1</sup>. Se llevó a cabo un monitoreo individual en la cual se observó que la maduración sexual se dio a los 6 días de vida, tuvieron 6 puestas con 15 crías por puesta y su promedio de vida fue de 29 días. Se realizaron pruebas de toxicidad utilizando arsénico, cadmio y plomo para conocer la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) a 24 horas: se prepararon distintas concentraciones del metal o metaloide en las cuales se agregaron 10 neonatos; después de 24 horas de exposición, se observaron bajo estereoscopio óptico para su clasificación. A partir de los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico probit dando como resultados de CL<sub>50</sub> a 24 horas 2.52 mg L<sup>-1</sup> de arsénico, 0.114 mg L<sup>-1</sup> de cadmio y 0.382 mg L<sup>-1</sup> de plomo. Para arsénico, el valor de CL<sub>50</sub> fue 13.45 veces mayor al límite máximo permisible para la descarga de aguas residuales en bienes nacionales; sin embargo, la CL<sub>50</sub> de cadmio se encontró por debajo de este límite y también para la descarga de aguas residuales al alcantarillado municipal. Para esta última norma, la CL<sub>50</sub> de plomo también fue menor al límite máximo permisible.

## **1. ANTECEDENTES**

### 1.1 La contaminación del agua.

La contaminación del agua es la presencia de componentes o factores químicos, físicos o biológicos que producen una condición de deterioro de un cuerpo de agua. El nivel de contaminación necesario para modificar las características del agua depende en gran medida del tipo de cuerpo de agua, su ubicación y los tipos de usos que admite. Un agua que se considera no apta para beber humana puede ser adecuada para otros usos, como el hábitat, el riego o la recreación. Entre los contaminantes presentes en el agua se encuentran los compuestos orgánicos que abarcan plaguicidas, herbicidas, compuestos derivados de la producción de energía y de combustión, los escombros y los plásticos, los metales y metaloides que incluyen antimonio, arsénico, berilio, cadmio, cromo, cobre, plomo, mercurio, níquel, selenio, plata, talio y zinc, los radionucleidos como uranio, torio y radio, y por supuesto los microorganismos que incluyen bacterias, protozoos, hongos y virus (Torok y col., 2017).

Los contaminantes provienen del uso de agroquímicos, minería, descargas industriales y fuentes domésticas que se vierten directa o indirectamente en los cuerpos de agua. Esto tiene repercusiones en la existencia de los organismos vivos y también en el entorno abiótico. Para los seres humanos el agua potable es una necesidad básica. Sin embargo, los organismos patógenos son la principal causa de transmisión de enfermedades además de una creciente contaminación química (Singh y col., 2017).

### 1.2 Metales y metaloides.

Dentro de las sustancias liberadas al ambiente, durante muchos años, los metales pesados y metaloides, provenientes de los desechos industriales, mineros y las actividades urbanas, han sido considerados como una de las principales fuentes de contaminación ambiental especialmente en ecosistemas acuáticos. La exposición humana a los metales pesados es uno de los factores de riesgo más importantes

principalmente en las áreas donde la actividad de extracción y procesamiento de minerales ha tenido o está teniendo lugar (Le y col., 2013). La producción mundial de minerales es enorme, tan sólo en el año 2016 se obtuvieron 19 500 millones de toneladas (Brown y col., 2018); en la actividad de minería además de los minerales con valor económico se generan residuos denominados jales (Wang y col., 2017). Éstos se obtienen en el proceso de concentración de minerales y, generalmente, son almacenados cerca de las instalaciones de la mina formando depósitos superficiales llamados presas de jales. La manera en la que los minerales se extraen de la ganga determina el tamaño de las partículas de los jales que pueden ir desde 2  $\mu\text{m}$  hasta 0.2 mm, esta característica principal permite que al estar almacenados a la intemperie puedan ser dispersados por la acción de agua (principalmente precipitación pluvial) y del viento, de este modo, los jales son depositados en suelos cercanos al sitio de almacenamiento o bien a cuerpos superficiales de agua a partir de los cuales pueden ser transportados a varios kilómetros de su origen (Bhuyan y col., 2017; Muszyńska y col., 2018). Por ejemplo los jales producidos durante su operación de la mina La Negra ubicada en el estado de Querétaro (México) se almacenaron en cinco depósitos construidos en cauces que descargan al río Maconí, el cual a su vez desemboca sobre el río Moctezuma a 5 km aguas abajo. Los jales contienen arsénico, plomo, cadmio, cobre y zinc (Santos-Jallath y col., 2013).

De los compartimentos ambientales, el suelo es en donde tiene lugar la acumulación de metales pesados y metaloides, no obstante los contaminantes pueden movilizarse y liberarse a cuerpos de agua cuando se alteran condiciones ambientales tales como el pH, el potencial redox y la salinidad (Li y col., 2017; Shi y col., 2018(b)). La toxicidad no depende de la concentración total de metales y metaloides sino de la concentración de la fracción extraíble bajo condiciones ambientales. Esta fracción es la que puede representar un riesgo ambiental debido a que es móvil en el ambiente y se considera como una medida indirecta de la fracción biodisponible porque logran atravesar la membrana celular viva y pueden alcanzar niveles tóxicos para organismos vivos como plantas, animales o humanos a través de la bioacumulación en la cadena trófica (Dziubanek y col., 2017; Martin y col., 2017).

### 1.2.1 Arsénico.

El arsénico (As) es un metaloide tóxico presente de forma natural en la corteza terrestre. La contaminación por arsénico es un problema mundial causado por condiciones naturales tales como la erosión de rocas de forma geológica rica en arsénico, la actividad biológica y la emisión volcánica, así como actividades humanas como quema de combustible, actividad minera y la fabricación industrial de vidrio, papel, semiconductores, pesticidas, herbicidas y desecantes de cultivos. Los cambios físicos, químicos y/o microbianos en el suelo pueden promover la movilización de arsénico de los minerales y su acumulación en las aguas subterráneas. El consumo de agua potable contaminada es la primera fuente de exposición al arsénico para millones de personas en varios países de Asia y América. Dado que el agua subterránea contaminada puede usarse para regar y cocinar cultivos de cereales y otros alimentos, los humanos también pueden estar expuestos al arsénico a través de la ingestión de vegetales, frutas, granos y arroz (Bellamri y col., 2018). El límite máximo permisible de arsénico en agua y hielo para consumo humano indicado en la NOM-201-SSA1-2015 es de  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ . El destino ambiental, la toxicidad y las estrategias de mitigación del arsénico dependen de su compleja especiación química como lo son la forma oxidada As (V) y reducida As (III). Entre los metales pesados contaminantes, el arsénico, el plomo y el cadmio son bien conocidos como contaminantes del agua que tienen un efecto altamente adverso en la salud de los humanos y organismos acuáticos (Le y col., 2013).

El arsénico es un metaloide no esencial que se supone tóxico en bajas concentraciones de exposición porque puede servir como sustituto de los elementos esenciales en los procesos biológicos, es decir, reemplazando el fósforo en la producción de fosfatasa. Esto a su vez puede interrumpir la producción de energía (Nagato y col., 2013). La exposición crónica al arsénico puede causar cáncer de piel, pulmón y vejiga. Los estudios epidemiológicos sugirieron una fuerte correlación entre la exposición crónica al arsénico y diversas enfermedades humanas no cancerosas como la hiperqueratosis, hiperpigmentación, debilidad, anemia, sensación de ardor en los ojos, hinchazón sólida de las piernas, fibrosis hepática, enfermedad pulmonar

crónica, gangrena en los dedos de los pies, neuropatía, aterosclerosis, diabetes y enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (Mandal, 2017).

### 1.2.2 Cadmio.

El cadmio (Cd) está muy extendido en el ambiente por medio de procesos naturales como la actividad volcánica y también por la actividad industrial, por ejemplo se usa como agente anticorrosivo, estabilizador en productos de PVC, pigmento, absorbente de neutrones en plantas de energía nuclear, y en la fabricación de baterías de níquel-cadmio (Pan y col., 2010). Es el metal pesado con uno de los mayores riesgos para la salud ya que muestra una alta toxicidad y ha demostrado tener potencial carcinogénico. La exposición crónica al cadmio puede provocar daños en los riñones y los huesos. Se ha demostrado que el cadmio puede reducir la fertilidad de los hombres y aumentar el riesgo de trastornos en el embarazo en las mujeres. La exposición dietética al cadmio constituye el factor de riesgo de cáncer de próstata, mama, ovario o endometrio. El cadmio se acumula en los organismos a través de la cadena alimentaria después de una exposición a largo plazo a niveles bajos, estimula el tracto respiratorio de los organismos y daña el hígado o riñones de animales (Ferain y col., 2018; Gao y col., 2018). La NOM-201-SSA1-2015 indica 0.003 mg L<sup>-1</sup> de cadmio como límite máximo permisible en agua y hielo para consumo humano.

### 1.2.3 Plomo.

El plomo (Pb) se ha utilizado en muchos productos como pintura, tuberías y cerámica, y sigue siendo un peligro para la población. Las principales fuentes de plomo y su contaminación son las operaciones mineras, las plantas de reciclaje de baterías y la fundición, así como la pintura vieja pelada o desconchada a base de plomo, especialmente durante las renovaciones de casas viejas, el contacto con polvo o tierra contaminada, plomo en tuberías, escape de automóviles, subproductos de la minería y el trabajo del metal, y diversos productos de consumo. El plomo no cumple ninguna función fisiológica pero existe en casi todos los sistemas biológicos. Se absorbe a través de diferentes rutas; los niños son más propensos a estar expuestos

que los adultos debido a una alta tasa de inhalación y mayor absorción intestinal. La exposición intensa y en altas dosis al plomo causa una intoxicación sintomática aguda, caracterizada por cólicos, anemia y depresión del sistema nervioso central que pueden provocar coma, convulsiones y la muerte. Ahora se sabe que los bajos niveles de plomo en sangre afectan a múltiples órganos en ausencia de síntomas aparentes. La toxicidad con bajos niveles de plomo en el útero y durante la infancia constituye un daño al cerebro y al sistema nervioso (AbuShady y col., 2017; Yabe y col., 2018). La normatividad mexicana de acuerdo a la NOM-201-SSA1-2015 establece un límite máximo permisible de  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  de plomo en agua y hielo para consumo humano.

### 1.3 Ensayos biológicos para determinar toxicidad.

La preocupación por la presencia y detección de agentes tóxicos en los ecosistemas aumentó dramáticamente en los últimos años, principalmente en el medio acuático. La contaminación acuática ha sido durante mucho tiempo evaluada solo por análisis químicos específicos. Sin embargo, el uso de ensayos biológicos puede proporcionar una medida de toxicidad directa y apropiada para complementar los análisis instrumentales otorgando una comprensión exhaustiva de la calidad del agua y los perfiles toxicológicos mostrando grandes ventajas tales como alta sensibilidad y eficiencia de tiempo (Shi y col., 2018(a)). El uso de métodos biológicos para la evaluación de la contaminación acuática muestra una alternativa importante en casos de contaminación rápida o difusa causantes potenciales de intoxicaciones agudas en humanos (Martins y col., 2007).

La toxicidad, definida por Castillo (2004) es la capacidad de una sustancia para provocar un efecto nocivo sobre un organismo o la comunidad biótica, y dependerá de las propiedades químicas del compuesto y de su concentración según sea la duración, frecuencia de la exposición a la sustancia y su relación con el ciclo de vida del organismo. El potencial nocivo puede ser contrarrestado por el sistema biológico a través de diferentes estrategias, tales como reacciones metabólicas de

desintoxicación, excreción de tóxicos, etcétera. Por tanto, la toxicidad aparente determinada en un bioensayo es el resultado de la interacción entre la sustancia y el sistema biológico. La ecotoxicología es una rama de la ciencia relativamente joven que fue definida por primera vez por el toxicólogo René Truhaut en 1969 como el estudio de efectos adversos de agentes químicos y físicos sobre organismos vivos y su entorno; tiene como objetivo desarrollar metodologías para ser utilizadas como herramientas de predicción tempranas que permitan definir umbrales permisibles de contaminantes y sirvan de guía a las entidades reguladoras para la toma de decisiones.

Varios países están utilizando bioensayos de toxicidad como parte de su sistema de monitoreo de la calidad del agua. Existe un interés creciente tanto del gobierno como de la industria en el uso de pruebas biológicas para la determinación de la toxicidad de compuestos químicos. Este interés se refleja en el desarrollo de pruebas más rápidas, simples y menos costosas con varios organismos que tienen la capacidad de detectar actividad química adversa (Ghosh y col., 2017).

De acuerdo a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, 2005): “un indicador es un parámetro, o valor derivado de otros parámetros, dirigido a proveer información y describir el estado de un fenómeno, con un significado añadido mayor que el directamente asociado con su propio valor. Los indicadores ambientales representan un instrumento de gran utilidad para organizar, sistematizar, cuantificar, simplificar y comunicar información relativa a distintos aspectos del medio, que resulta básica para la toma de decisiones en el marco de la gestión ambiental”.

El desarrollo de un indicador consiste en el conocimiento de qué y cómo se debe medir y monitorear un fenómeno de interés para la producción de información. Los resultados proporcionarán las bases para la toma de decisiones (Romanelli y Massone, 2016).

#### 1.4 *Daphnia* sp.

Debido a su relevancia ecológica como consumidores primarios los crustáceos se utilizan ampliamente en agua dulce y marina. Muchas especies han sido seleccionadas como organismos modelo de prueba para una amplia gama de bioensayos ecotoxicológicos. Varias especies ya son parte de protocolos de pruebas de toxicidad estandarizados. El género *Daphnia* se ubica dentro del suborden Cladóceras de la clase Crustácea y son los más utilizados como organismos de referencia en bioensayos de toxicidad. Las características que han hecho de este grupo un ideal para la evaluación de toxicidad son la distribución geográfica amplia, que forman parte de la comunidad zooplanctónica, la facilidad de cultivo en laboratorio, su reproducción partenogenética que asegura uniformidad de respuesta y su corto ciclo de vida con una producción de un alto número de crías. Especies como *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* y *Daphnia similis* son utilizadas extensivamente en pruebas de toxicidad por lo cual es existente la información que necesitan sobre técnicas de cultivo, requisitos de temperatura, luz y nutrientes (Campana, 2017).

Los cladóceros son un eslabón importante en la cadena alimentaria en el ecosistema acuático porque se encuentran en la parte inferior de la cadena trófica de agua dulce. Una especie utilizada es *Daphnia magna* Straus que es altamente sensible a las sustancias tóxicas, tiene un tiempo de generación corto, se multiplica muy rápidamente, se aclimata fácilmente en condiciones de laboratorio, se cultiva en un espacio pequeño y se puede medir toxicidad en un período relativamente corto (Tyagi y col., 2007). Por otro lado, *Daphnia pulex* es la especie más común de pulga de agua y es un organismo que se puede encontrar en casi todos los cuerpos de agua eutróficos (ricos en nutrientes). El tamaño relativamente grande de estos organismos (0.2 a 3 mm) simplifica su observación y análisis. Se alimentan de fitoplancton, bacterias y pequeñas partículas de sedimento. El género *Daphnia* se ha utilizado para investigar la toxicidad de metales en ambientes de agua dulce como zinc, cobre, plomo y arsénico (Caumett y col., 2012).



Existen numerosos estudios en peces en donde se estudiaron los efectos tóxicos de efluentes residuales pero no se le ha dado mucha relevancia a los efectos adversos sobre el plancton siendo este el eslabón previo a los peces en la cadena alimentaria. Martins y col. (2007) realizaron una recopilación de datos concluyendo que las pruebas de toxicidad aguda con *Daphnia magna* responden a una mayor variedad de productos químicos que con *Danio rerio* (pez cebra). Reportan también que la sensibilidad de la prueba aguda de los cladóceros es siempre más alta que la prueba con peces especialmente para metales, plaguicidas, compuestos y solventes de nitrógeno. Aunque los mamíferos, los crustáceos y los peces tienen diferentes rutas de exposición, órganos destino y mecanismos tóxicos, los ensayos de toxicidad aguda con peces y *Daphnia* pueden usarse para proporcionar información importante y relevante con respecto a la posible intoxicación crónica oral en humanos como un examen inicial previo a utilizar los modelos de mamíferos. Además de esto, las pruebas con *Daphnia magna* tienen un tiempo de exposición de 48 horas como máximo por lo que se pueden obtener respuestas un 50% más rápido que las que se tienen con peces. Esto es especialmente importante en caso de intoxicación aguda ya que se necesitan respuestas más rápidas para evitar riesgos ambientales y de la salud humana. Las pruebas de toxicidad aguda en peces han sido criticadas por razones económicas, logísticas y éticas. Por lo tanto, el género *Daphnia* puede usarse como sistema de alerta en caso de contaminación aguda del agua tales como derrames accidentales, descarga de aguas residuales industriales, contaminación aguda por plaguicidas, intoxicación accidental o intencionada.

En pocas palabras, el microcrustáceo *Daphnia* es un elemento que se encuentra siempre presente en los ecosistemas acuáticos donde ocupa una posición intermedia en la cadena alimentaria, lo que lo hace importante en la transferencia trófica de contaminantes. Dada su distribución común, su ciclo de vida corto (aproximadamente 40 días), accesible para el cultivo y sensible a la contaminación tóxica, *Daphnia* se ha utilizado ampliamente como modelo biológico animal para las pruebas de toxicidad (Lv y col., 2018).

## **2. HIPÓTESIS**

*Daphnia* sp. es un organismo que cuenta con características que le permiten ser empleado como bioindicador para arsénico, cadmio y plomo en agua dulce en el rango de concentraciones comparables con los límites máximos permisibles de calidad de aguas indicados en la normatividad mexicana.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general.

Evaluar a *Daphnia* sp. como bioindicador de arsénico, cadmio y plomo en agua.

#### 3.2 Objetivos específicos.

- Analizar el ciclo de vida de *Daphnia* sp. y establecer las condiciones de cultivo en laboratorio.
- Determinar la concentración letal media y 90 (CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub>) a 24 horas de arsénico, cadmio y plomo en *Daphnia* sp.
- Evaluar a *Daphnia* sp. como un bioindicador en lixiviados de suelos contaminados con arsénico y plomo.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales y métodos.

#### 4.1.1 Cría y mantenimiento de *Daphnia* sp.

Se colectó *Daphnia* sp. por muestreo en un estanque de agua de Rana Toro en el campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro con coordenadas geográficas 20°42'21.13"N, 100°15'35.59"W. Las muestras se trasladaron al laboratorio y se colocaron en peceras de capacidad de 3 L. Se colocaron dos focos fluorescentes conectados a un temporizador para garantizar un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad con ayuda de una estructura, de esta forma la luz incidió por arriba de las peceras según lo reportado por Olvera y col. (2010) y Terra y Gonçalves (2013). La colocación de la cepa en peceras pequeñas de 3 L se hizo con el objetivo de mantener la limpieza y alimentación periódicamente, de esta forma se evitó la formación de sedimento en exceso y por consiguiente la degradación de materia orgánica que causa una disminución del oxígeno disuelto.

La alimentación de *Daphnia* sp. se realizó con *Chlorella*, esta microalga se cultivó en un matraz Erlenmeyer con 200 mL de agua de garrafón Aguaq® con parámetros fisicoquímicos dados en el Cuadro 1 y con 4 mL de Bold modified basal freshwater solution (50X) de Sigma®, se colocó en un invernadero con condiciones controladas de temperatura, el proceso se realizó cada semana con 1 mL de *Chlorella*. La adición de microalgas a las peceras de cultivo de *Daphnia* sp. se realizó cada semana; al término de cada mes, el agua se cambió por completo utilizando agua de garrafón Aguaq® para evitar la adición de cloro y la dureza del agua fuera menor respecto al agua del grifo. Se colocó un filtro que pudiera retener a las microalgas y a la *Daphnia* sp., se decantó el contenido de la pecera sobre él y los organismos que se fueran quedando sobre el filtro se pasaron a una pecera con agua y alimento nuevo. Se tuvo mucho cuidado con el sedimento sobrante ya que no se filtró sino que se desechó en la tarja. Se utilizó el multiparamétrico portátil Hach® Senslon 156 previamente calibrado con soluciones estándar para el monitoreo de pH, conductividad, oxígeno disuelto y temperatura del agua. Para temperatura ambiente se midió con ayuda de

un termómetro de mercurio. Se determinaron otros parámetros como nitratos, fosfatos y DBO<sub>5</sub>.

Cuadro 1. Parámetros fisicoquímicos de agua embotellada Aguaq®.

Parámetro	Valor	Unidad
Color	0	Co-Pt
Turbiedad	0.26	UNT
Coliformes totales	Ausencia	UFC/100 mL
Arsénico	<0.0095	mg L <sup>-1</sup>
Bario	0.164	mg L <sup>-1</sup>
Cadmio	<0.0008	mg L <sup>-1</sup>
Cromo total	<0.0098	mg L <sup>-1</sup>
Cobre	<0.170	mg L <sup>-1</sup>
Manganeso	<0.016	mg L <sup>-1</sup>
Mercurio	0.0007	mg L <sup>-1</sup>
Nitratos	<0.956	mg L <sup>-1</sup>
Nitritos	<0.010	mg L <sup>-1</sup>
Plomo	<0.0049	mg L <sup>-1</sup>

Proporcionados por el Dr. Víctor Pérez Moreno. Laboratorio de tratamiento de aguas.

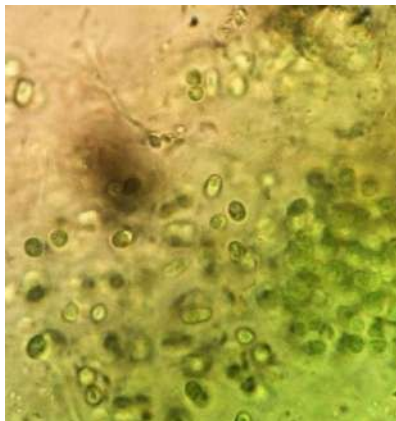


Figura 1. *Chlorella* 400X.

#### 4.1.2 Seguimiento del ciclo de vida.

Para el monitoreo del ciclo de vida se tomaron 8 neonatos de menos de 24 horas de nacidos de la misma puesta, se colocaron de forma individual en vasos de precipitados con agua de composición similar a la del cultivo y se registró la fecha de inicio del proceso. La alimentación y limpieza se mantuvieron durante todo el periodo de monitoreo. Los individuos se observaron a diario para registrar la formación de huevos en su bolsa de incubación, también se registraron el número de crías y de puestas a lo largo de su vida. Las crías se removieron de los vasos de precipitado y se añadieron al cultivo general. Por último, se registró el tiempo en el que se sucedió la muerte del individuo.

#### 4.1.3 Bioensayos para determinar toxicidad.

Para el desarrollo de ensayos de toxicidad aguda se emplearon neonatos de menos de 24 horas de nacidos. Los reactivos utilizados fueron arseniato de disodio  $\text{HAsNa}_2\text{O}_4$ , nitrato de plomo (II)  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  y cloruro de cadmio  $\text{CdCl}_2$ . Primero, se realizó una prueba exploratoria, en la cual se prepararon concentraciones con una escala logarítmica: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100  $\text{mg L}^{-1}$ , además de un control negativo. Todas las concentraciones incluyendo el control se realizaron por triplicado. Se colocaron 50 mL de cada una de las soluciones en vasos de precipitado y se transfirieron 5 neonatos. Se dejaron en exposición a 24 horas; posteriormente se observaron bajo estereomicroscopio Olympus® SZ4045 a 40 aumentos y se realizó un conteo para clasificar en “vivos y con movimiento”, “vivos inmóviles” y “muertos” según OECD (2005): los animales que nadaban y se observaba movimiento trasladándose por el medio se les contaba como “vivos y con movimiento”; “vivos inmóviles” fueron aquellos que no pudieron nadar en 15 segundos después de una agitación suave del recipiente incluso si aún podían mover su antenas y “muertos” cuando carecían de movimiento totalmente y se notó ausencia de latido del corazón. Con esto se estableció el intervalo de concentraciones entre el cual se observó el 0 y 100% de mortalidad.

Posteriormente se realizó el ensayo definitivo con las concentraciones determinadas a partir del primero. En este caso, se tomaron 10 neonatos de menos de 24 horas de nacidos y fueron transferidos a los vasos de precipitado con 50 mL de cada una de las concentraciones. Después de 24 horas de exposición se observaron bajo estereomicroscopio Olympus® SZ4045 a 40 aumentos con un reproductor de imágenes digital Celestron® 44421 y se realizó el conteo para clasificar en “vivos con movimiento”, “vivos inmóviles” y “muertos”. Del mismo modo que en el primer ensayo se utilizó un blanco negativo y se hizo por triplicado. A partir de estos datos se realizó el análisis de resultados para la obtención de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y 90 (CL<sub>90</sub>) a 24 horas, es decir, la concentración que produce la muerte del 50% y 90% de la población respectivamente después de 24 horas de exposición. Para ello se utilizó el software estadístico Minitab ya que se elaboró un análisis estadístico probit.

#### 4.1.4 Análisis de lixiviados de suelos contaminados.

Se utilizaron 2 tipos de suelos contaminados:

- Suelo de Zimapán, Hgo., contaminado con arsénico.
- Suelo contaminado con plomo.

Para la obtención del lixiviado se siguió la metodología de la NOM-141-SEMARNAT-2003 en su Anexo Normativo 5 que especifica la prueba para realizar la extracción de metales y metaloides en jales con agua en equilibrio con CO<sub>2</sub>. Se preparó solución extractante de la siguiente forma: se burbujeó aire en agua destilada hasta alcanzar un pH de  $5.5 \pm 0.2$ , para alcanzar este pH se agregaron pequeños volúmenes de una solución de HCl 0.01 N.

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de vidrio de capacidad de 250 mL y se les colocó un tapón de hule. Se le agregaron 11 g de sólidos en base seca de suelo y se añadió solución extractante hasta que se alcanzó una relación a 20 veces el peso en gramos

de suelo, es decir se utilizaron 220 mL de solución extractante. Se agitó la muestra continuamente por 18 horas a temperatura ambiente. El agitador utilizado tiene una velocidad de 31 rpm.



Figura 2. Agitador de 31 rpm.

Terminada la agitación se destapó el matraz, se dejó reposar la muestra y se filtró la fase acuosa. A partir de la muestra acuosa se prepararon diluciones para obtener 100, 50, 25, 12.5 y 6.25%. Se realizó el bioensayo toxicológico transfiriendo 10 neonatos de menos de 24 horas de nacidos en 50 mL de cada dilución, utilizando un control negativo y se hizo por triplicado. Se dejaron expuestos por 24 horas y se contó el número de organismos vivos y muertos en cada uno.

Por último, se realizó el análisis por espectroscopia de absorción atómica por horno de grafito de las muestras para la determinación de arsénico y plomo. Se utilizó el instrumento Varian SpectrAA 220 Atomic Absorption Spectrometer con muestreador automático GTA 110. Se utilizaron los estándares High-Purity Standards® 1000±3 µg mL<sup>-1</sup> Pb con número de lote 1812942 y J. T. Baker® 1000 µg mL<sup>-1</sup> As con número



de lote C44649. La Q. Areli Rodríguez Ontiveros proporcionó las condiciones de la rampa de temperatura para ambos métodos.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Cría y mantenimiento de *Daphnia* sp.

La temperatura del agua en el presente trabajo fue de 23.3°C (Cuadro 2), Ocampo (2010) reportó una temperatura del agua de 23°C para la cría de *Daphnia magna*. La temperatura ambiental de la cría de *Daphnia* sp. fue de 25°C, este mismo valor fue reportado por Ocampo (2010). Chen y col. (2012) reportaron ausencia de fuerza de motilidad de *Daphnia magna* a 0°C después de 16 horas; a 5°C disminuyó 60% después de 3 horas de exposición; en el rango de 10 a 30°C no se observaron cambios significativos de la fuerza de motilidad. Lennon y col. (2001) reportaron la disminución de la tasa de crecimiento poblacional de *Daphnia lumholtzi* a partir de 30°C; con base en lo anterior, la temperatura en la que se crió *Daphnia* sp. fue la óptima. El oxígeno disuelto en la cría en laboratorio fue de 6.61 mg L<sup>-1</sup>, Marinho (2014) mencionó que el este parámetro de debe mantener por encima de 6.0 mg L<sup>-1</sup> lo que ocurrió en el presente trabajo. Por otro lado Ferreira y col. (2008) reportaron una correlación inversamente proporcional entre el oxígeno disuelto 2 a 9 mg L<sup>-1</sup> O<sub>2</sub> y la toxicidad aguda de cadmio y carbendazim en *Daphnia magna*. Además se ha reportado que las condiciones por debajo de 2 mg L<sup>-1</sup> oxígeno disuelto, causaron disturbios en el metabolismo de *Daphnia magna* (Garreta-Lara y col., 2018). Homer y Waller (1983) reportaron que para valores de 2.7 mg L<sup>-1</sup> a 7.6 mg L<sup>-1</sup> de oxígeno disuelto no hubo una diferencia significativa para el crecimiento fisiológico ni para la reproducción de *Daphnia magna*. El valor de pH en el agua de cría de *Daphnia* sp. fue de 7.30 promedio lo cual es un potencial hidrógeno neutro y está dentro del rango adecuado para la cría según Ghazy y col. (2011), ellos reportaron una disminución de la población de *Daphnia magna* del 53% a un pH de 4.44 y de 33% a pH de 10.55 a 21 días; el rango adecuado de pH para *D. magna* fue desde 4.55 hasta 10.13, dentro de estos valores el rango óptimo fue de 7.9 a 8.3.

En el presente trabajo se reportan 0.108 mg L<sup>-1</sup> de fosfatos y 1.45 mg L<sup>-1</sup> de nitratos. Torrentera y Tacon (1989) y Zhu y col. (2015) reportaron que las cantidades de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de fosfatos y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de nitratos en el agua estimulan la reproducción y la madurez sexual para *Daphnia* sp.; Maceda-Veiga y col. (2015) reportaron la

reducción de la densidad poblacional a 11 individuos por litro ( $\text{ind L}^{-1}$ ) en concentraciones de nitratos de  $250 \text{ mg L}^{-1}$ , a comparación de  $>100 \text{ ind L}^{-1}$  en concentración de nitratos  $<35 \text{ mg L}^{-1}$  en el agua de cría de *Daphnia magna*. Respecto a los fosfatos, Kim y col. (2013) reportaron  $\text{EC}_{50}$  de  $5.35 \text{ mg L}^{-1}$  para fosfato tricálcico y  $\text{EC}_{50}$  de  $2.9 \text{ mg L}^{-1}$  para fosfato dicálcico en la misma especie. El fosfato de trifenilo  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  tuvo una diferencia significativa en la disminución de la tasa de reproducción y en la longitud de *Daphnia magna* respecto a  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  según lo reportado por Yuan y col. (2018). Cabe aclarar que las concentraciones de nitratos y fosfatos no se añadieron en forma de sales como los procedimientos OECD (2005) o la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010 sino que fueron dadas por el tipo de agua y alimento suministrado. Esto fue porque se buscó mantener el cultivo de *Daphnia* sp. de una forma más sencilla sin tener que usar reactivos químicos específicos, de esta manera se volvió más económico y fácil de trabajar en cuanto a la renovación del agua de cultivo.

Los valores de dureza y alcalinidad para el presente trabajo fueron de 418 y  $39.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  respectivamente. Bogart y col. (2016) reportaron mortalidad mayor al 98% para *Daphnia magna* a  $600 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  de dureza junto con  $420 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  de alcalinidad después de 96 horas de exposición; además reportaron la formación de calcita dada por la dureza y alcalinidad del agua. El agua de cría a estos valores se le considera dura; como se observa en el Cuadro 3 los cladóceros tuvieron un promedio de vida de 29 días lo cual es mucho mayor a 96 horas reportadas por Bogart y col. (2016) para el agua dura. Esto quiere decir que *Daphnia* sp. podría ser utilizada en muestras de aguas duras sin que esto influya en el desarrollo del bioensayo toxicológico. El valor de  $\text{DBO}_5$  para el presente trabajo fue de  $51.8 \text{ mg L}^{-1}$ . Gholami-Borujeni y col. (2018) reportaron que la toxicidad de un efluente de agua residual es independiente de la concentración de  $\text{DBO}_5$  en *Daphnia magna*.

Cuadro 2. Parámetros fisicoquímicos del agua para la cría de *Daphnia* sp. en laboratorio.

Parámetro	Valor	Unidad	Referencia
Intensidad luminosa	861	Lux, luz fría	NOM-025-STPS-2008
Temperatura del agua	23.3	°C	NMX-AA-007-SCFI-2013
Temperatura ambiente	25	°C	-
pH	7.30		NMX-AA-008-SCFI-2016
Conductividad	1.36	mS cm <sup>-1</sup>	NMX-AA-093-SCFI-2000
Oxígeno disuelto	6.61	mg L <sup>-1</sup>	NMX-AA-012-SCFI-2001
Dureza	418	mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	NMX-AA-072-SCFI-2001
Alcalinidad	39.7	mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	NMX-AA-036-SCFI-2001
Fosfatos	0.108	mg L <sup>-1</sup>	NMX-AA-029-SCFI-2001
Nitratos	1.45	mg L <sup>-1</sup>	Duque, 2007.
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO <sub>5</sub> )	51.8	mg L <sup>-1</sup>	NMX-AA-028-SCFI-2001

## 5.2 Seguimiento del ciclo de vida.

El seguimiento del ciclo de vida se realizó después de tener los parámetros fisicoquímicos del agua de cría debido a que *Daphnia* sp. se observó en reproducción asexual. En las Figuras 4 y 5 se muestran las diferentes bolsas incubadoras de las hembras en reproducción sexual y asexual. Dinh y col. (2018) reportaron en sus resultados que la reproducción asexual es un ciclo partenogenético en el cual las hembras producen huevos diploides que se desarrollan directamente en hijas; en la reproducción sexual la hembra produce huevos haploides que requieren fertilización de los machos, una vez fertilizados se envuelven en una capa protectora llamada efipio. La forma de reproducción sexual se da al tener ambiente desfavorable, por ello el efipio es una capa rica en queratina que protegerá a los huevos de la luz UV, la desecación y los parásitos hasta que el medio sea favorable nuevamente. En la

Figura 4 se puede observar el efipio como una bolsa incubadora de color negro, esta fotografía fue tomada en fecha en la cual los organismos se encontraban en el periodo de aclimatación. La Figura 5 se puede observar la bolsa incubadora transparente sin efipio lo cual indica las condiciones apropiadas para la reproducción asexual partenogenética.

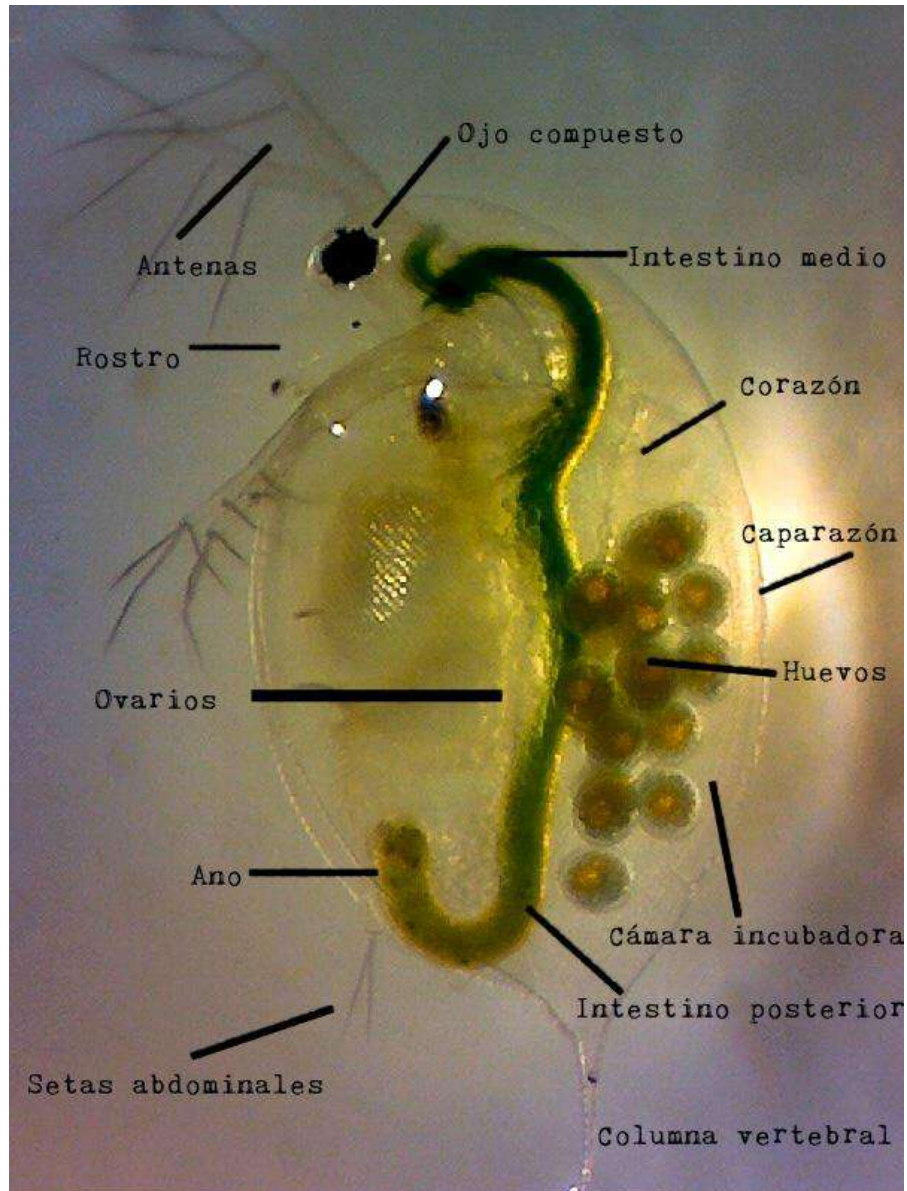


Figura 3. Morfología de *Daphnia* sp., vista lateral 30X.

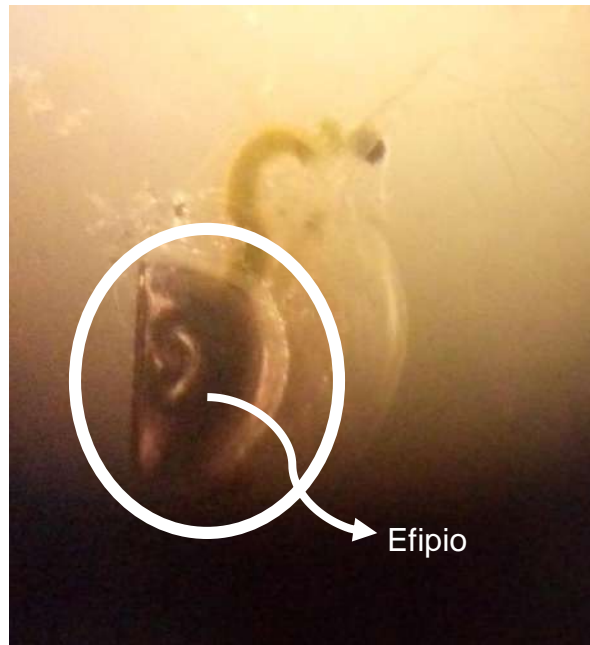


Figura 4. Hembra en reproducción sexual con formación de efipio, marzo 2017, 30X.

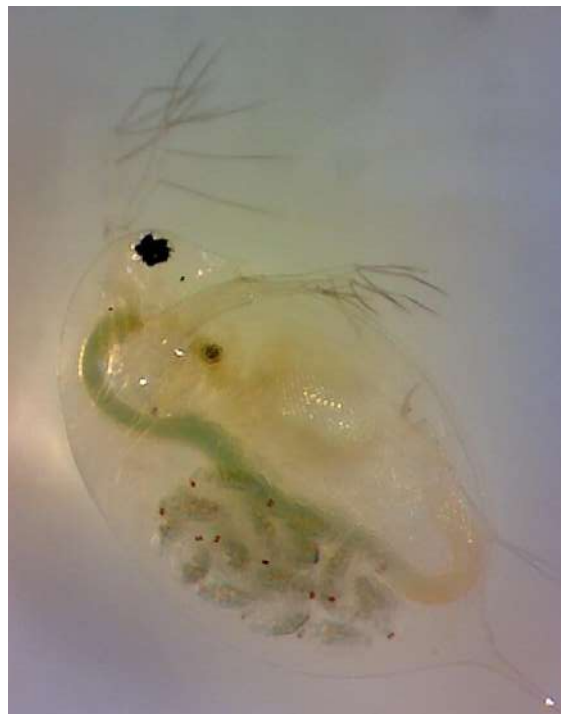


Figura 5. Hembra en reproducción asexual partenogénica, abril 2017, 30X.

En el Cuadro 3 se observan los resultados obtenidos del monitoreo de hembras asexuales, la madurez sexual se determinó al día en que se dio la formación de los primeros huevecillos la cual ocurrió a los 6 días para todos los individuos; en el transcurso de estos primeros días crecieron hasta la fase adulto. Se observó que el tiempo en que se formaron los huevos y se convirtieron en pequeñas *Daphnias* de 1 a 2 días de edad. A partir de la formación de la primera generación, la hembra tuvo una puesta cada 2 o 3 días teniendo en promedio 6 puestas y de cada puesta, se tuvieron 15 crías. También se notó que una semana previa a la muerte, la hembra ya no fue capaz de procrear. La longevidad fue de 29 días. Wang y col., (2018) reportaron para *Daphnia similis* que el tiempo promedio hasta la primera cría fue de 7.75 días y el número de neonatos por puesta fueron 21.5, estas son 6.5 crías más de lo observado en el presente trabajo. Steinkey y col., (2018) reportaron para *Daphnia magna* que la edad de madurez sexual fue de 10 días, con 3 puestas con 10 neonatos de cada puesta. En *Daphnia* sp. el número de puestas y de crías fueron 2 y 1.5 veces mayores respectivamente a las reportadas por Steinkey y col. (2018).

Cuadro 3. Ciclo de vida promedio de *Daphnia* sp. en reproducción partenogenética.

Edad de madurez sexual (días)	6 ± 0
Puestas a lo largo de su vida	6 ± 3.35
Crías por puesta	15 ± 0.75
Longevidad (días)	29 ± 12.52

Los valores representan el promedio de 8 repeticiones ± desviación estándar.

### 5.3 Bioensayos para determinar toxicidad.

#### 5.3.1 Bioensayo con arsénico.

En los bioensayos de toxicidad con *Daphnia* sp., se utilizaron neonatos de menos de 24 horas de nacidos (OECD, 2005) para obtener uniformidad de respuesta ya que los neonatos tuvieron la misma edad. No se utilizaron hembras adultas puesto que se observó que su reproducción puede darse de un día para otro y los bioensayos tuvieron una duración de 24 horas según Le y col. (2013), esto significa que si se

llegasen a utilizar adultos en una prueba de toxicidad, al siguiente día se podrían observar más individuos de los que inicialmente se colocaron, además no se tendrían individuos de la misma edad. El bioensayo exploratorio tuvo el objetivo de determinar un nuevo rango de concentraciones en donde se encontró letalidad entre el 0 y 100%, por ello en el ensayo exploratorio las concentraciones tuvieron una escala logarítmica; en el caso del arsénico (Figura 6), al igual que en el cadmio y plomo, se utilizaron 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 mg L<sup>-1</sup>.

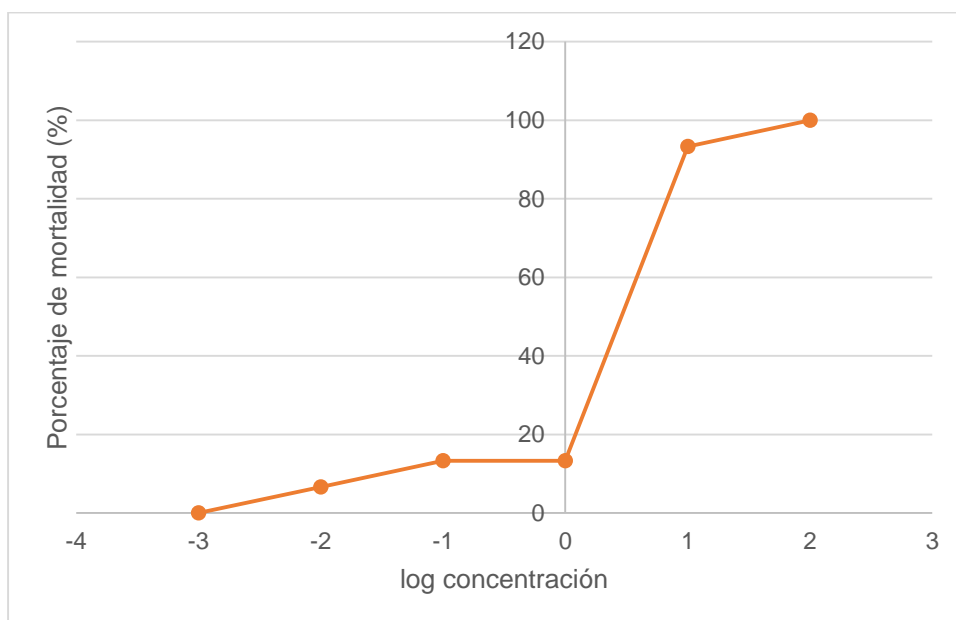


Figura 6. Dosis – efectos letales de exposición a arsénico en ensayo exploratorio.

En la Figura 6 se puede observar que a partir del valor de logaritmo de concentración -2 en el eje de las x (0.01 mg L<sup>-1</sup> As) comenzó a darse el efecto letalidad y se tuvieron 4 puntos intermedios entre el 0 y 100% de letalidad: los 3 primeros puntos presentaron una letalidad menor al 20% y el siguiente punto se presentó arriba del 90%. Entonces para el rango definitivo se tomaron los valores de logaritmo de concentración 0 y 1, es decir, entre 1 y 10 mg L<sup>-1</sup> As.



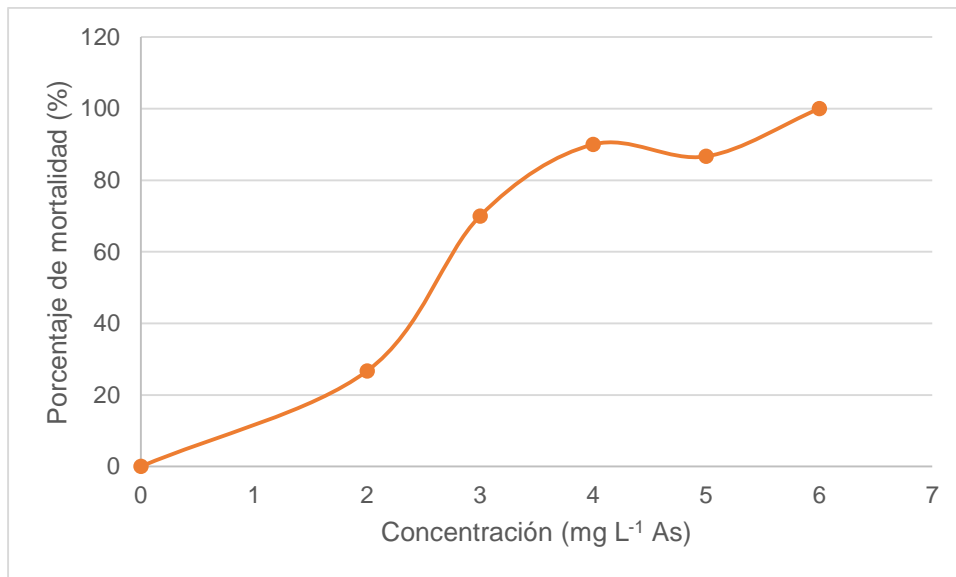


Figura 7. Dosis – efectos letales de exposición a arsénico en ensayo definitivo.

En la Figura 7 se muestra la curva dosis – respuesta con la cual se calculó la CL<sub>50</sub>, en la gráfica se observa que el 50% de porcentaje de mortalidad se dio entre 2 y 3 mg L<sup>-1</sup>. Para hacer el cálculo no sólo se utilizaron estos 2 valores sino que se usaron todos los puntos que hayan quedado entre el 0 y 100% de letalidad, en este caso 2, 3, 4 y 5 mg L<sup>-1</sup> As.

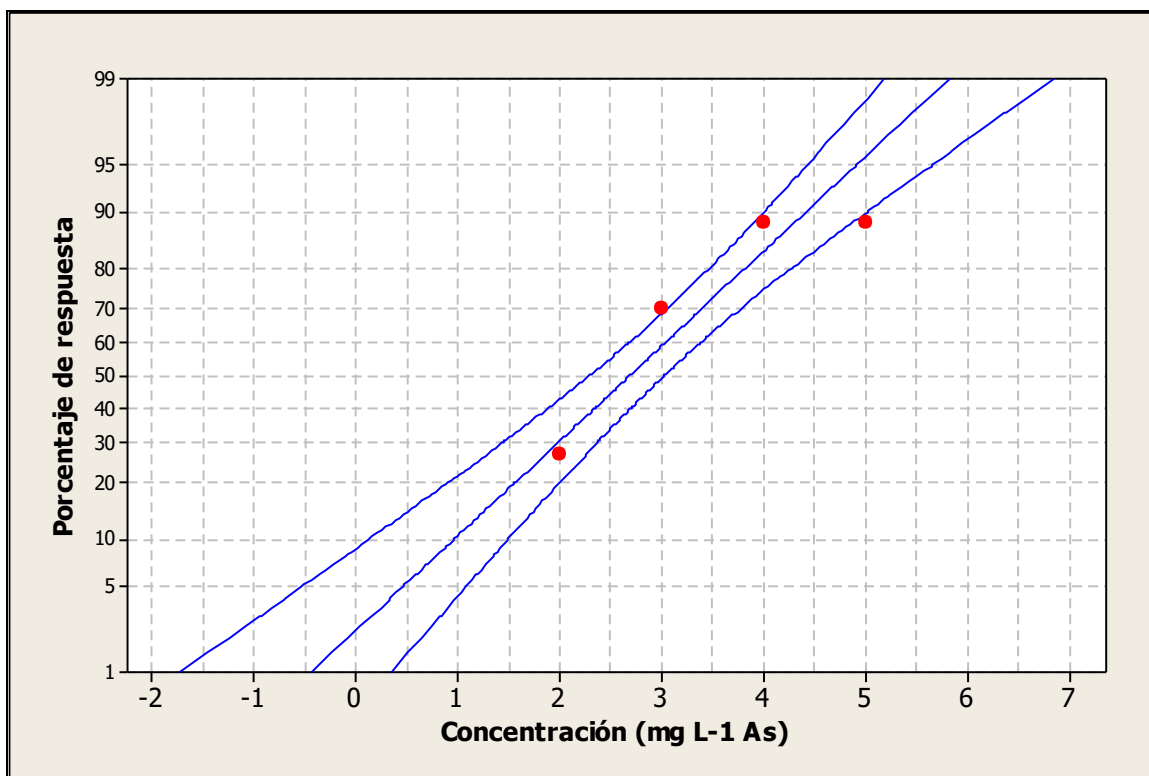


Figura 8. Análisis probit para arsénico. Intervalos de confianza al 95%.

La gráfica resultante del análisis estadístico probit se muestra en la Figura 8, este tipo de análisis transforma una curva no lineal a la forma de la ecuación de la recta, de este modo se puede calcular la  $CL_{50}$  e incluso la concentración letal a cualquier porcentaje que se desee puesto que la recta no sólo es calculada entre los puntos sino que se extrapola hasta 1% y 99% de letalidad. La  $CL_{50}$  es un valor que puede cambiar de un estudio a otro debido al medio de prueba, las condiciones de iluminación u otro parámetro. Por ejemplo, la  $CL_{50}$  que Martins y col. (2007) reportaron  $CL_{50}$  de  $7.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ As (III)}$  en *Daphnia magna*, Zheng y col. (2017)  $2.93 \text{ mg L}^{-1} \text{ As (III)}$  y  $5.23 \text{ mg L}^{-1} \text{ As (V)}$  para *D. magna*, Cui y col. (2018) reportaron un valor de  $2.04 \text{ mg L}^{-1} \text{ As (III)}$  en *Daphnia galeata*. Como se puede observar en el Cuadro 4, el valor obtenido fue  $2.69 \text{ mg L}^{-1} \text{ As (V)}$  teniendo más similitud con Cui y col. (2018) y Zheng y col. (2017). Sin embargo, el número de oxidación no corresponde ya en este trabajo se utilizó As (V).

Cuadro 4. CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> a 24 horas de arsénico.

		Límite inferior	Límite superior
CL <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> As)	2.69	2.30	3.03
CL <sub>90</sub> (mg L <sup>-1</sup> As)	4.42	4.01	5.02

La norma NOM-001-SEMARNAT-1996 indica un límite máximo permisible para descarga de aguas residuales en aguas nacionales de 0.2 mg L<sup>-1</sup> de arsénico, mientras que la NOM-002-SEMARNAT-1996 establece los límites máximos permisibles para descargas de aguas residuales al alcantarillado municipal de 0.75 mg L<sup>-1</sup>. En la presente investigación la CL<sub>50</sub> de *Daphnia* sp. fue de 2.69 mg L<sup>-1</sup>, este valor es superior al establecido 13.45 y 3.6 veces respectivamente a ambas Normas Oficiales Mexicanas por lo que no se recomienda utilizar *Daphnia* sp. como bioindicador.

### 5.3.2 Bioensayo con cadmio

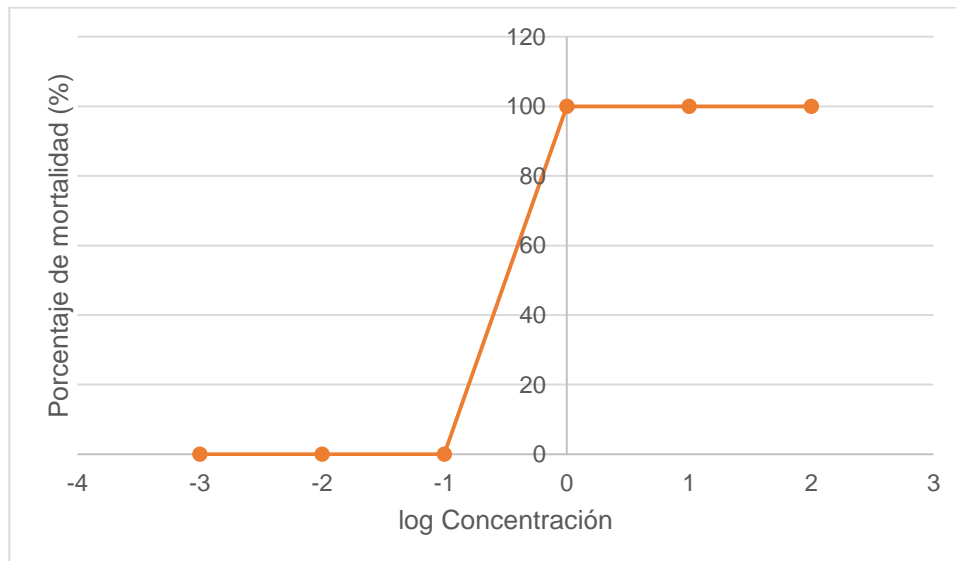


Figura 9. Dosis – efectos letales de exposición a cadmio en ensayo exploratorio.

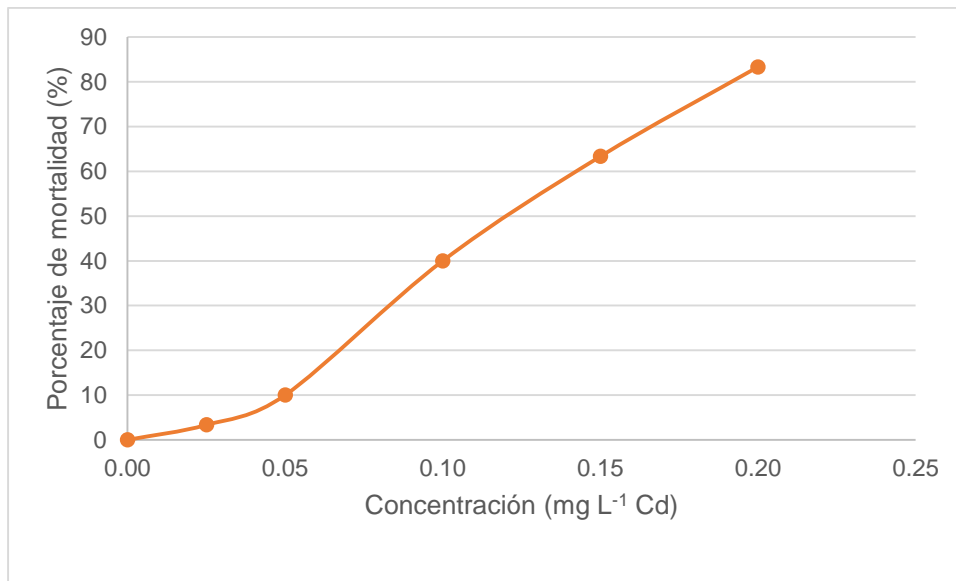


Figura 10. Dosis – efectos letales de exposición a cadmio en ensayo definitivo.

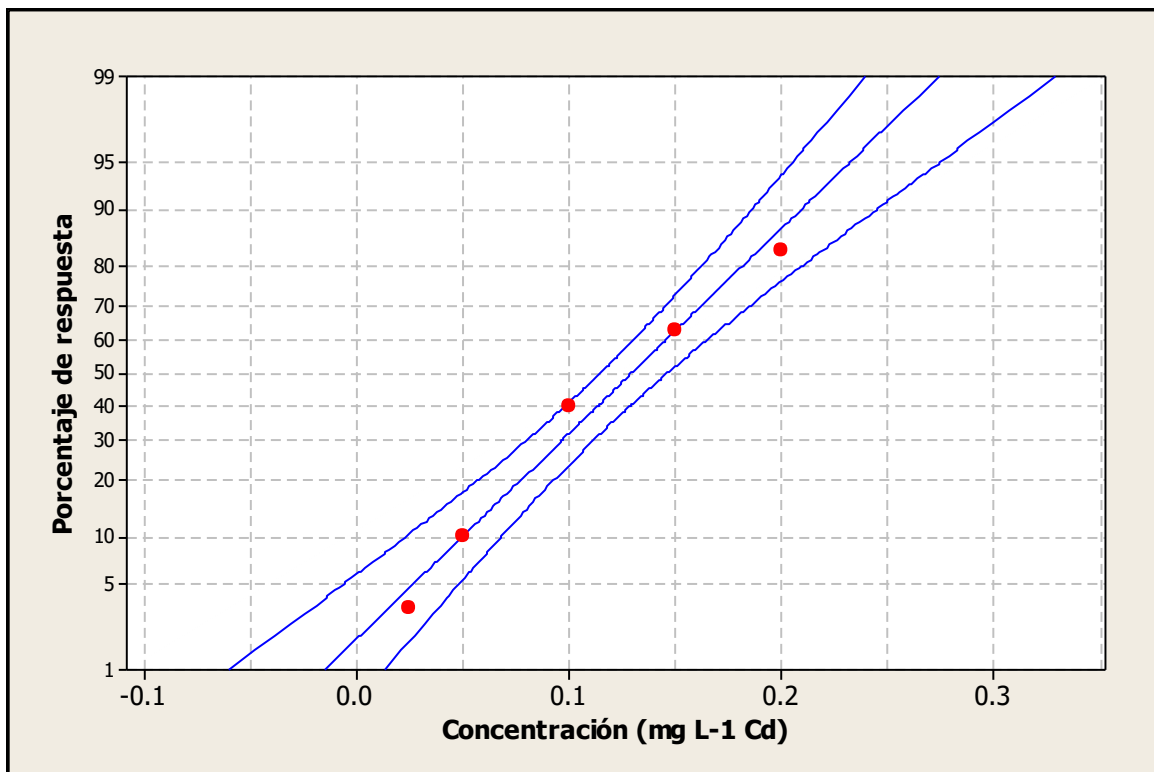


Figura 11. Análisis probit para cadmio. Intervalos de confianza al 95%.

En la Figura 9 se observa que el cambio de 0 a 100% de letalidad se dio entre el logaritmo de concentración -1 y 0, es decir entre 0.1 y 1 mg L<sup>-1</sup> Cd. A partir de estos resultados, se realizó el bioensayo definitivo mostrado en la Figura 10 en la cual se observó que, excluyendo el primer punto correspondiente al control negativo, hay 5 puntos que se encontraron con porcentaje de letalidad. La curva trazada no se pudo ajustar a la ecuación de la recta directamente ya que se observó un comportamiento sigmoideo, por ello se realizó el análisis estadístico probit mostrado en la Figura 11 y entonces se calculó la CL<sub>50</sub>.

Cuadro 5. CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> a 24 horas de cadmio.

		Límite inferior	Límite superior
CL <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> Cd)	0.130	0.115	0.147
CL <sub>90</sub> (mg L <sup>-1</sup> Cd)	0.209	0.186	0.245

Existe el registro de CL<sub>50</sub> a 24 horas de parte de varios autores como son Martins y col. (2007) quienes reportaron 0.121 mg L<sup>-1</sup> Cd en *Daphnia magna*, Ferreira y col. (2008) obtuvieron un valor de 0.079 mg L<sup>-1</sup> Cd en *D. magna* pero éste a 48 horas y Cui y col. (2018) presentaron un resultado con *Daphnia galeata* de 0.19 mg L<sup>-1</sup> Cd (II). La concentración letal media obtenida en el Cuadro 5 es muy similar a la dada por Martins y col. (2007).

La norma NOM-001-SEMARNAT-1996 indica un límite máximo permisible para descarga de aguas residuales en aguas nacionales de 0.2 mg L<sup>-1</sup> de cadmio, mientras que la NOM-002-SEMARNAT-1996 indica 0.75 mg L<sup>-1</sup> (límites máximos permisibles para descargas de aguas residuales al alcantarillado municipal). La CL<sub>50</sub> de *Daphnia* sp. fue de 0.130 mg L<sup>-1</sup>, este valor fue menor al establecido y por lo tanto *Daphnia* sp. puede ser utilizada como bioindicador para cadmio por estas Normas Oficiales Mexicanas. Sin embargo, las normas NOM-127-SSA1-1994 Y NOM-201-SSA1-2015 tienen como límite máximo permisible para agua potable, agua y hielo

para consumo humano de 0.005 y 0.003 mg L<sup>-1</sup> respectivamente lo cual significa que *Daphnia* sp. no puede ser bioindicador para agua potable, agua y hielo para consumo humano.

### 5.3.3 Bioensayo con plomo

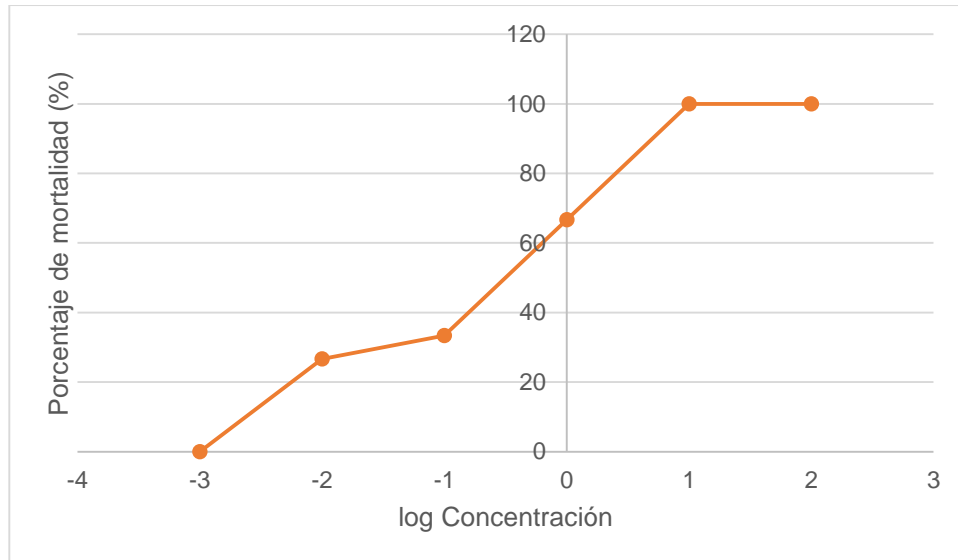


Figura 12. Dosis – efectos letales de exposición a plomo en ensayo exploratorio.

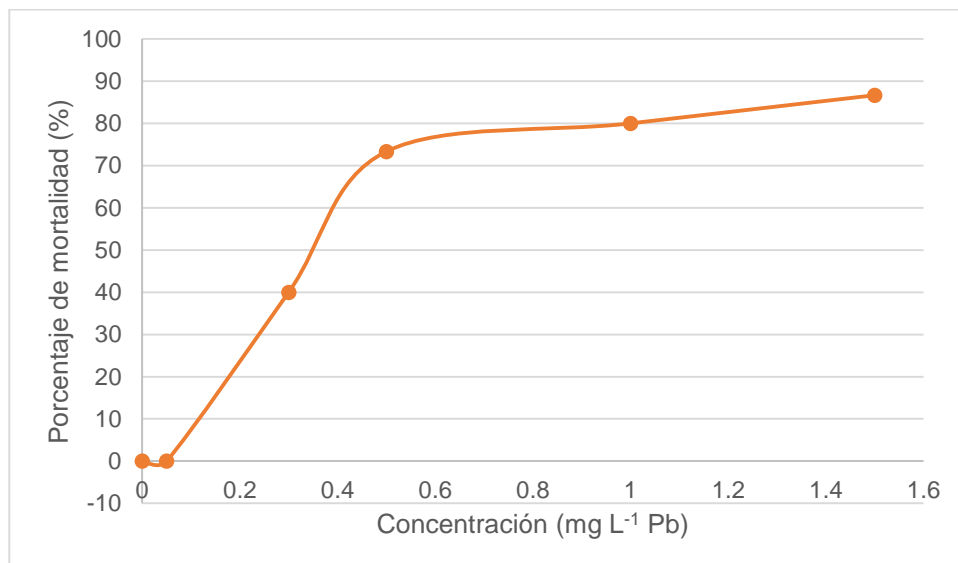


Figura 13. Dosis – efectos letales de exposición a plomo en ensayo definitivo.

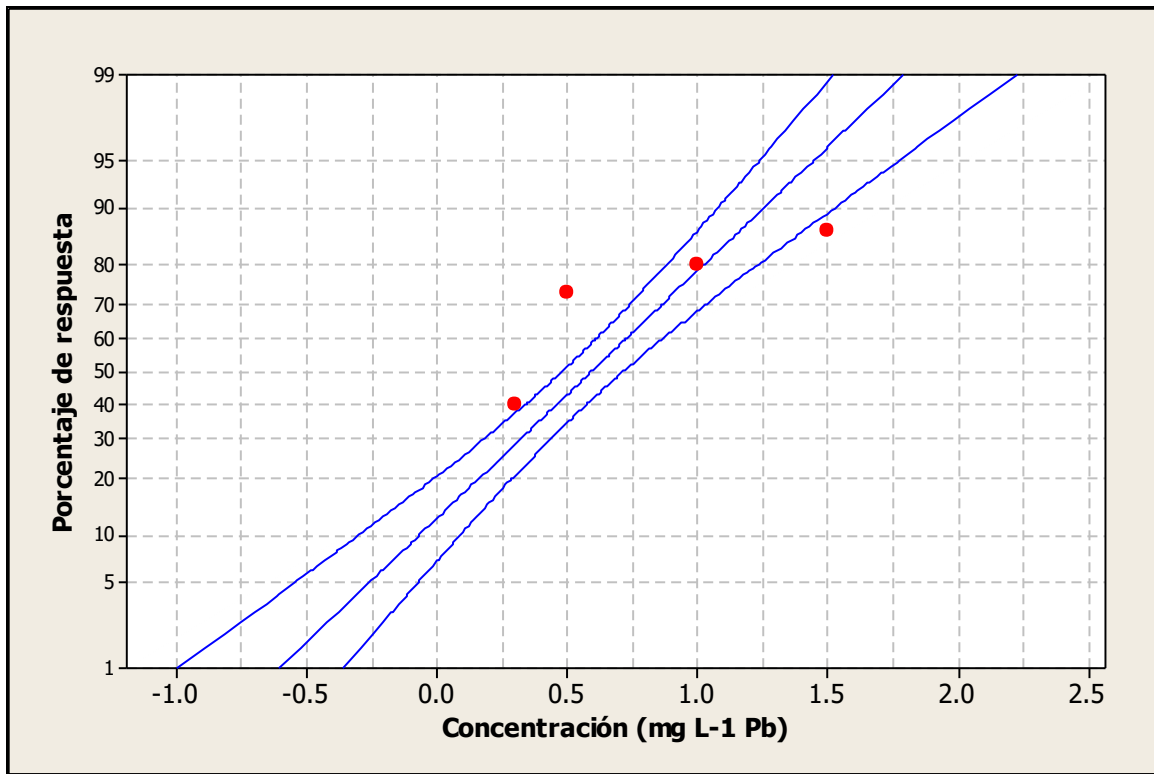


Figura 14. Análisis probit para plomo. Intervalos de confianza al 95%.

La Figura 12 presenta el ensayo exploratorio para plomo en el que se presentaron tres puntos intermedios de letalidad en -2, -1 y 0 de logaritmo de la concentración, esto fue 0.01, 0.1 y 1 mg L<sup>-1</sup> Pb, entonces para el bioensayo definitivo mostrado en la Figura 13 se utilizaron concentraciones alrededor de las anteriores para tener un porcentaje de letalidad y lograr el análisis probit con al menos cuatro puntos, por ello se usaron 0.05, 0.3, 0.5, 1.0 y 1.5 mg L<sup>-1</sup> Pb. En el blanco negativo no se encontraron individuos muertos así como en la concentración 0.05 mg L<sup>-1</sup> Pb. Para calcular la CL<sub>50</sub> es necesario que la recta se construyera con al menos un punto por abajo o por arriba del 50%, en este caso en la Figura 14 se puede observar que sí se cumplió con la condición porque el primer punto está por debajo y los demás fueron mayores al 50% de letalidad.

Cuadro 6. CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> a 24 horas de plomo.

		Límite inferior	Límite superior
CL <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> Pb)	0.595	0.482	0.717
CL <sub>90</sub> (mg L <sup>-1</sup> Pb)	1.25	1.08	1.53

En el Cuadro 6 se puede observar que el resultado de CL<sub>50</sub> fue mayor al reportado por Cooper y col. (2009) que obtuvieron a 48 horas el valor de 0.444 mg L<sup>-1</sup> Pb para *Daphnia carinata*. Sin embargo, la CL<sub>50</sub> del presente trabajo es más parecida a Cui y col. (2018) ya que reportan 0.58 mg L<sup>-1</sup> Pb (II) para *Daphnia galeata* a 24 horas.

La NOM-002-SEMARNAT-1996 establece los límites máximos permisibles para descargas de aguas residuales al alcantarillado municipal indica 1.5 mg L<sup>-1</sup> de plomo. La CL<sub>50</sub> de *Daphnia* sp. fue de 0.595 mg L<sup>-1</sup>, este valor fue menor al establecido y por lo tanto *Daphnia* sp. puede ser utilizada como bioindicador para plomo en aguas residuales descargadas al alcantarillado. Sin embargo, la norma NOM-001-SEMARNAT-1996 indica un límite máximo permisible para descarga de aguas residuales en aguas nacionales de 0.4 mg L<sup>-1</sup> de plomo; las normas NOM-127-SSA1-1994 Y NOM-201-SSA1-2015 tienen como límite máximo permisible para agua potable, agua y hielo para consumo humano de 0.025 y 0.01 mg L<sup>-1</sup> respectivamente lo cual significa que *Daphnia* sp. no puede ser bioindicador para agua residual descargada en aguas nacionales, agua potable, agua y hielo para consumo humano.

#### 5.4 Análisis de lixiviados de suelos contaminados.

La forma de lixiviación de los suelos se realizó con agua en equilibrio con CO<sub>2</sub> para simular de una mejor forma lo que pasaría realmente en el ambiente con la lluvia e incluso con lluvia ácida. Se sabe que en la química del suelo, el pH influye en la carga superficial de componentes del suelo como los óxidos de hierro y manganeso, hidróxidos, carbonatos y materia orgánica. A pH ácido la concentración en el medio acuoso de cationes metálicos será mayor que a pH neutro o alcalino y con esto se



logra la movilización entre compartimentos ambientales (Bakhshipour y col., 2016; Aharonov-Nadborny y col., 2018). El pH del agua usada para la lixiviación fue de 5.5 aproximadamente pero el pH fue neutro al final de la agitación.

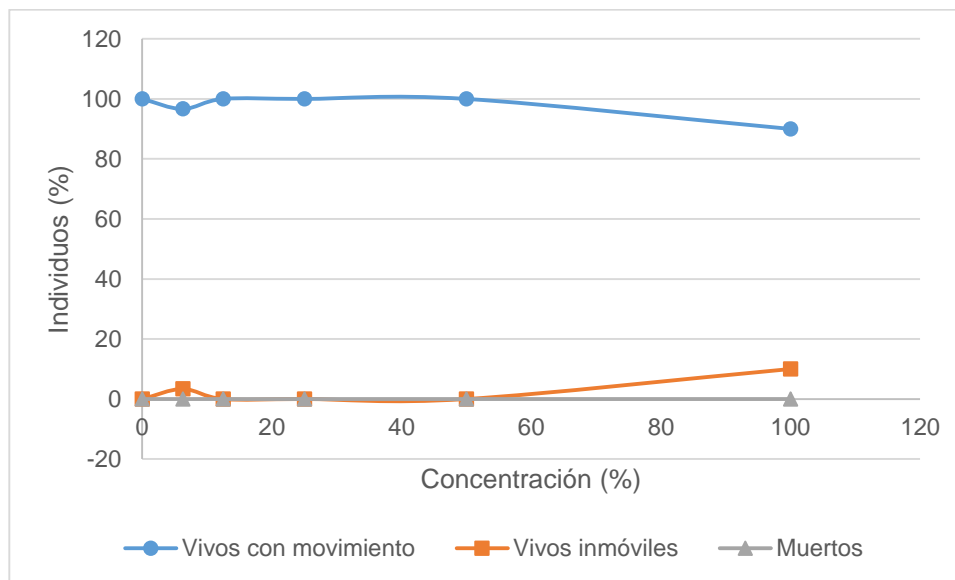


Figura 15. Bioensayo con lixiviado de suelo contaminado con arsénico.

En la Figura 15 se muestran los resultados de la exposición al lixiviado contaminado, se puede observar por la línea marcada con triángulos que no se registraron muertes en el 100% de lixiviado y tampoco en las diluciones. Se observó que hay inmóviles en el punto de 100% de lixiviado pero con esto no se puede concluir una contaminación con arsénico sin un análisis de determinación.

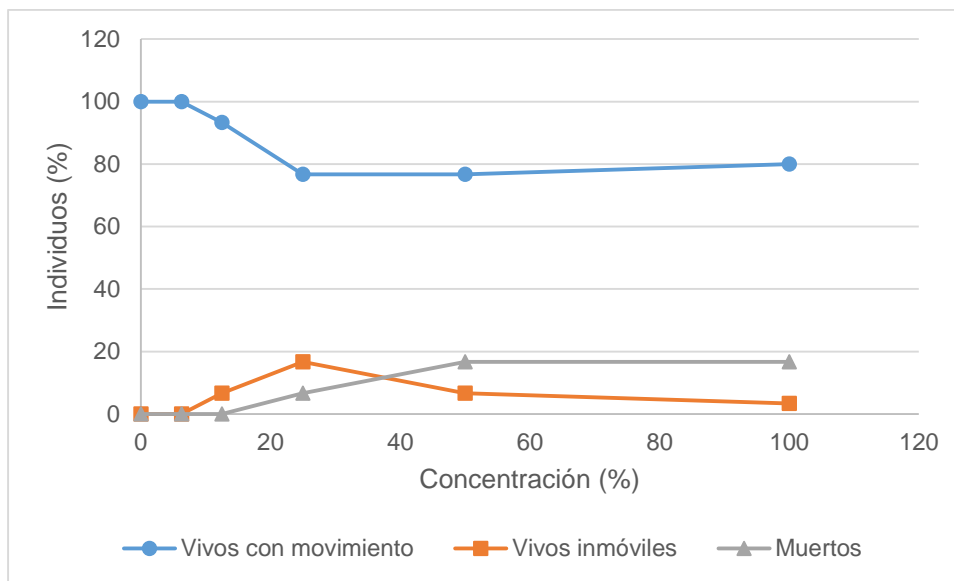


Figura 16. Bioensayo con lixiviado de suelo contaminado con plomo.

Por otro lado, en la Figura 16 se presenta el bioensayo con otro tipo de suelo y con plomo como contaminante. Se observó que a la dilución de 12.5%, el 6.7% de los cladóceros comenzaron a presentar inmovilidad y aumentó en el siguiente punto en donde también se comenzó a tener letalidad. Las concentraciones determinadas según la mortandad de *Daphnia* sp. para plomo presentes en el lixiviado fueron de 0.269, 0.229 y 0.115mg L<sup>-1</sup>.

Cuadro 7. Cálculo de la concentración de plomo en el lixiviado a partir del bioensayo con *Daphnia* sp.

Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	% lixiviado	% mortalidad	Concentración de la muestra calculada
0.0673	25	6.7	0.269
0.1147	50	16.7	0.229
0.1147	100	16.7	0.115

Cuadro 8. Análisis de los lixiviados por espectroscopía electrotrémica.

Suelo	Analito	Valor	Unidad
Jales mineros de Zimapan, Hgo., contaminado con arsénico 9051.92 mg kg <sup>-1</sup> *	Arsénico	12.8	mg L <sup>-1</sup>
Suelo contaminado con plomo	Plomo	No detectable	mg L <sup>-1</sup>

\*suelo proporcionado por la Q. Mayelín Rosquete Bassó

Para el primer bioensayo se determinó una concentración de arsénico de 12.8 mg L<sup>-1</sup>; 5 veces superior a su CL<sub>50</sub> (2.69 mg L<sup>-1</sup>). La ausencia de muertes en este bioensayo se atribuyó al número de oxidación, ya que para la determinación de la concentración letal media en este trabajo se utilizó As (V) el cual es menos tóxico que el As (III). La toxicidad y la movilidad de As en el cuerpo humano es As (III) > As (V) > arsénico orgánico (Sattar y col., 2016). El arsénico se encuentra en el ambiente en su forma inorgánica como especie trivalente As (III) en condiciones anóxicas o pentavalente As (V) bajo condiciones óxicas en ambiente acuático (Qi y Pichler, 2017).

La toxicidad de As (III) está relacionada con su alta afinidad por los grupos sulfhidrilo de las biomoléculas lo cual causa la inhibición de funciones enzimáticas cruciales dentro de las células (Aposhian y Aposhian, 2006; Sharma y Sohn, 2009). Por otro lado, la toxicidad microbiana del As (V) es el resultado de su potencial para el reemplazo de fosfato, desacopla la formación de ATP, lo que finalmente resulta en el agotamiento de la energía celular (Rosen y Tamás, 2010). El lixiviado de suelo contaminado con arsénico pudo presentar una combinación de As (III) y As (V), esta mezcla no causó mortandad en *Daphnia* sp. La espectrometría de absorción atómica electrotrémica es una técnica instrumental eficiente para determinar concentraciones de analito total, es decir, que no es para una forma de analito específica, además la

matriz con sustancias orgánicas residuales del material digerido, puede eliminarse en parte durante el aumento gradual de la temperatura antes de la atomización del analito (Shemirani y col., 2005).

## 6 CONCLUSIONES

- 1) Las condiciones óptimas para la reproducción exitosa de *Daphnia* sp. fueron: dureza 418 mg L<sup>-1</sup>, alcalinidad 39.7 mg L<sup>-1</sup>, pH de 7.3, fosfatos 0.108 mg L<sup>-1</sup>, nitratos 1.45 mg L<sup>-1</sup>, conductividad de 1.36 mS cm<sup>-1</sup> y oxígeno disuelto de 6.61 mg L<sup>-1</sup>.
- 2) Se cultivó exitosamente *Daphnia* sp. con periodo de longevidad de 29 días y con éxito de reproducción asexual de 6 puestas con 15 crías cada una.
- 3) Las concentraciones letales medias CL<sub>50</sub> en esta investigación para *Daphnia* sp. fueron 0.130 mg L<sup>-1</sup>, 0.595 mg L<sup>-1</sup> y 2.69 mg L<sup>-1</sup> para cadmio, plomo y arsénico respectivamente; así como las CL<sub>90</sub> fueron de 0.209 mg L<sup>-1</sup>, 1.25 mg L<sup>-1</sup> y 4.42 mg L<sup>-1</sup>.
- 4) *Daphnia* sp. no es una especie bioindicadora para el biomonitoreo de arsénico en agua; la CL<sub>50</sub> fue 13.45 veces superior al límite máximo permisible de 0.2 mg L<sup>-1</sup> de la NOM-001-SEMARNAT-1996.
- 5) *Daphnia* sp. es una especie bioindicadora para el biomonitoreo de cadmio y plomo; para cadmio respecto a las Normas NOM-001-SEMARNAT-1996 y NOM-002-SEMARNAT-1996; y para plomo sólo en la NOM-002-SEMARNAT-1996 porque las CL<sub>50</sub> de estos metales pesados se encuentran por debajo de los límites máximos permisibles.

## 7 REFERENCIAS

**AbuShady** MM, Fathy HA, Fathy GA, abd el Fatah S, Ali A, Abbas MA. Blood lead levels in a group of children: the potential risk factors and health problems. *Jornal de Pediatria (Versão em Português)*, **2017**;93(6):619-624.

**Aharonov-Nadborny** R, Tsechansky L, Raviv M, Graber ER. Mechanisms governing the leaching of soil metals as a result of disposal of olive mill wastewater on agricultural soils. *Science of The Total Environment*, **2018**;630:1115-1123.

**Aposhian** HV, Aposhian MM. Arsenic toxicology: five questions. *Chemical research in toxicology*, **2006**;19(1):1-15.

**Bakhshipour** Z, Asadi A, Huat BB, Sridharan A, Kawasaki S. Effect of acid rain on geotechnical properties of residual soils. *Soils and Foundations*, **2016**;56(6):1008-1020.

**Barbosa** M, Inocentes N, Soares AM, Oliveira M. Synergy effects of fluoxetine and variability in temperature lead to proportionally greater fitness costs in *Daphnia*: A multigenerational test. *Aquatic Toxicology*, **2017**;193:268-275.

**Bellamri** N, Morzadec C, Fardel O, Vernhet L. Arsenic and the immune system. *Current Opinion in Toxicology*, **2018**.

**Bhuyan** MS, Bakar MA, Akhtar A, Hossain MB, Ali MM, Islam MS. Heavy metal contamination in surface water and sediment of the Meghna River, Bangladesh. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, **2017**;8:273-279.

**Brown** TJ, Idoine NE, Raycraft ER, Shaw RA, Hobbs SF, Everett P, Deady EA, Bide T. World mineral production 2012-16. British Geological Survey, Keyworth, Nottingham. **2018**.

**Campana** O, Wlodkovic D. The undiscovered country: ecotoxicology meets microfluidics. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2017**.

**Castillo** G. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, **2004**;11 ,17-18, 52.

**Caumette** G, Koch I, Moriarty M, Reimer KJ. Arsenic distribution and speciation in *Daphnia pulex*. *Science of the Total Environment*, **2012**;432:243-250.

**Chen L**, Fu XE, Zhang G, Zeng Y, Ren Z. Influences of Temperature, pH and Turbidity on the Behavioral Responses of *Daphnia magna* and Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) in the Biomonitor. *Procedia Environmental Sciences*, **2012**;13:80-86.

**Cooper NL**, Bidwell JR, Kumar A. Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2009**;72(5):1523-1528.

**Cui R**, Kwak JI, An YJ. Comparative study of the sensitivity of *Daphnia galeata* and *Daphnia magna* to heavy metals. *Ecotoxicology and environmental safety*, **2018**;162:63-70.

**Dinh HDK**, Tran THN, Lu TL, Nghiep TH, Le PN, Do HLC. The effect of food, light intensity and tank volume on resting eggs production in *Daphnia carinata*. *Journal of environmental management*, **2018**;217:226-230.

**Duque M**. Nitrato en agua por espectrofotometría ultravioleta. Instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales. Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. República de Colombia. **2017**.

**Dziubanek G**, Baranowska R, Ówieląg-Drabek M, Sychała A, Piekut A, Rusin M, Hajok I. Cadmium in edible plants from Silesia, Poland, and its implications for health risk in populations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2017**;142:8-13.

**Ferain A**, De Saeyer N, Larondelle Y, Rees JF, Debier C, De Schamphelaere KA. Body lipid composition modulates acute cadmium toxicity in *Daphnia magna* adults and juveniles. *Chemosphere*, **2018**;205:328-338.

**Ferreira AL**, Loureiro S, Soares AM. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, **2008**;89(1):28-39.

**Gao M**, Zhang Z, Lv M, Song W, Lv Y. Toxic effects of nanomaterial-adsorbed cadmium on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2018**;148:261-268.

**Garreta-Lara E**, Campos B, Barata C, Lacorte S, Tauler R. Combined effects of salinity, temperature and hypoxia on *Daphnia magna* metabolism. *Science of The Total Environment*, **2018**;610:602-612.

**Ghazy** MME, Habashy MM, Mohammady EY. Effects of pH on survival, growth and reproduction rates of the crustacean, *Daphnia magna*. Aust J Basic Appl Sci, **2011**;5(11):1-10.

**Gholami-Borujeni** F, Nejatizadeh-Barandozi F, Aghdasi H. Data on effluent toxicity and physicochemical parameters of municipal wastewater treatment plant using *Daphnia Magna*. Data in Brief, **2018**;19:1837-1843.

**Ghosh**, P., Thakur, I. S., & Kaushik, A. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. Ecotoxicology and environmental safety, **2017**;141:259-270.

**Homer** DH, Waller WT. Chronic effects of reduced dissolved oxygen on *Daphnia magna*. Water, Air, and Soil Pollution, **1983**;20(1):23-28.

**Khalid** S, Shahid M, Niazi NK, Murtaza B, Bibi I, Dumat C. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. Journal of Geochemical Exploration, **2017**;182:247-268.

**Kim** E, Yoo S, Ro HY, Han HJ, Baek YW, Eom IC, Kim HM, Kim P, Choi K. Aquatic toxicity assessment of phosphate compounds. Environmental health and toxicology, **2013**:28.

**Le** TH, Lim ES, Hong NH, Lee SK, Shim YS, Hwang JR, Min J. Proteomic analysis in *Daphnia magna* exposed to As (III), As (V) and Cd heavy metals and their binary mixtures for screening potential biomarkers. Chemosphere, **2013**;93:2341-2348.

**Lennon** JT, Smith VH, Williams K. Influence of temperature on exotic *Daphnia lumholtzi* and implications for invasion success. Journal of Plankton Research, **2001**;23(4):425-433.

**Li** X, Peng W, Jiang Y, Duan Y, Ren J, Liu Y, Fan W. The *Daphnia magna* role to predict the cadmium toxicity of sediment: Bioaccumulation and biomarker response. Ecotoxicology and Environmental Safety, **2017**;138:206-214.

**Lv** X, Yang Y, Tao Y, Jiang Y, Chen B, Zhu X, Cai Z, Li B. A mechanism study on toxicity of graphene oxide to *Daphnia magna*: Direct link between bioaccumulation and oxidative stress. Environmental Pollution, **2018**;234:953-959.

**Maceda-Veiga** A, Webster G, Canals O, Salvadó H, Weightman AJ, Cable J. Chronic effects of temperature and nitrate pollution on *Daphnia magna*: Is this cladoceran



suitable for widespread use as a tertiary treatment?. Water research, **2015**;83:141-152.

**Mandal** P. An insight of environmental contamination of arsenic on animal health. Emerging Contaminants, **2017**;3(1):17-22.

**Marinho** YF, Brito LO, Silva CVF, Santos IGS, Galvez AO. Effect of addition of *Navicula* sp. on plankton composition and postlarval growth of *Litopenaeus vannamei* reared in culture tanks with zero water exchange. Submission article platform-Latin American Journal of Aquatic Research, **2017**;42(3):427-437.

**Martin** AP, Turnbull RE, Rissmann CW, Rieger P. Heavy metal and metalloid concentrations in soils under pasture of southern New Zealand. Geoderma Regional, **2017**;11:18-27.

**Martins** J, Teles LO, Vasconcelos V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. Environment International, **2007**;33(3):414-425.

**Muszyńska** E, Labudda M, Róžańska E, Hanus-Fajerska E, Znojek E. Heavy metal tolerance in contrasting ecotypes of *Alyssum montanum*. Ecotoxicology and environmental safety, **2018**;161:305-317.

**Nagato** EG, Jessica C, Lankadurai BP, Poirier DG, Reiner EJ, Simpson AJ, Simpson MJ. <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics investigation of *Daphnia magna* responses to sub-lethal exposure to arsenic, copper and lithium. Chemosphere, **2013**;93:331-337.

NMX-AA-007-SCFI-2013, Análisis de agua. Medición de la temperatura en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

NMX-AA-008-SCFI-2016, Análisis de agua. Medición del pH en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

NMX-AA-012-SCFI-2001, Análisis de agua. Determinación de oxígeno disuelto en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

NMX-AA-028-SCFI-2001, Análisis de agua. Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales, residuales (DBO<sub>5</sub>) y residuales tratadas. Método de prueba.

NMX-AA-029-SCFI-2001, Análisis de aguas. Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

NMX-AA-036-SCFI-2001, Análisis de agua. Determinación de acidez y alcalinidad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

NMX-AA-072-SCFI-2001, Análisis de agua. Determinación de dureza total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

NMX-AA-087-SCFI-2010, Análisis de agua. Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, Straus (Crustacea - Cladocera). Método de prueba.

NMX-AA-093-SCFI-2000, Análisis de agua. Determinación de la conductividad electrolítica. Método de prueba.

NOM-001-SEMARNAT-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

NOM-002-SEMARNAT-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal.

NOM-025-STPS-2008, Condiciones de iluminación en los centros de trabajo.

NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

NOM-141-SEMARNAT-2003, Que establece el procedimiento para caracterizar los jales, así como las especificaciones y criterios para la caracterización y preparación del sitio, proyecto, construcción, operación y postoperación de presas de jales.

NOM-201-SSA1-2015, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias.

**Ocampo** LE, Botero-Aguirre MC, Restrepo-Betancur LF. (2010). Evaluación del crecimiento de un cultivo de *Daphnia magna* alimentado con *Saccharomyces cerevisiae* y un enriquecimiento con avena soya. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, **2010**;23:78-85.

**OECD**. Chemicals, D. O. F. O. Guideline for testing of chemicals, **2005**.

**Olvera-Ramírez** R, Centeno-Ramos C, Martínez-Jerónimo F. Efectos tóxicos de *Pseudanabaena tenuis* (Cyanobacteria) en los cladóceros *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia*. Hidrobiológica, **2010**;20(3):203-212.

**Pan J**, Plant JA, Voulvoulis N, Oates CJ, Ihlenfeld C. Cadmium levels in Europe: implications for human health. *Environmental geochemistry and health*, **2010**;32(1):1-12.

**Qi P**, Pichler T. Competitive adsorption of As (III), As (V), Sb (III) and Sb (V) onto ferrihydrite in multi-component systems: Implications for mobility and distribution. *Journal of hazardous materials*, **2017**;330:142-148.

**Romanelli A**, Massone HE. Desarrollo de indicadores ambientales e índice de calidad de lagos someros pampeanos de Argentina con alta intervención antrópica. *Tecnología y ciencias del agua*, **2016**;7(6):123-137.

**Rosen BP**, Tamás MJ. Arsenic transport in prokaryotes and eukaryotic microbes. In *MIPs and Their Role in the Exchange of Metalloids*, **2010**:47-55.

**Santos-Jallath JE**, Coria-Camarillo J, Huezco-Casillas JDJ, Rodríguez-Cruz G. Influencia de jales mineros sobre el río Maconí, Queretaro, y evaluación del proceso de atenuación natural por dispersión. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, **2013**;65:645-660.

**Sattar A**, Xie S, Hafeez MA, Wang X, Hussain HI, Iqbal Z, Pan Y, Iqbal M, Shabbir MA, Yuan, Z. Metabolism and toxicity of arsenicals in mammals. *Environmental toxicology and pharmacology*, **2016**;48:214-224.

**Sharma VK**, Sohn M. (2009). Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environment international*, **2009**;35(4):743-759.

**Shemirani F**, Baghdadi M, Ramezani M. Preconcentration and determination of ultra trace amounts of arsenic (III) and arsenic (V) in tap water and total arsenic in biological samples by cloud point extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **2005**;65(4):882-887.

**Shi P**, Zhou S, Xiao H, Qiu J, Li A, Zhou Q, Pan Y, Hollert H. Toxicological and chemical insights into representative source and drinking water in eastern China. *Environmental Pollution*, **2018**;233:35-44(a).

**Shi T**, Ma J, Wu X, Ju T, Lin X, Zhang Y, Li X, Gong Y, Hou H, Zhao L, Wu F. Inventories of heavy metal inputs and outputs to and from agricultural soils: A review. *Ecotoxicology and environmental safety*, **2018**;164:118-124(b).

- Singh** G, Kaushik SK, Mukherji S. Revelations of an overt water contamination. Medical Journal Armed Forces India, **2017**;73(3):250-255.
- Steinkey** D, Lari E, Woodman SG, Luong KH, Wong CS, Pyle GG. Effects of gemfibrozil on the growth, reproduction, and energy stores of *Daphnia magna* in the presence of varying food concentrations. Chemosphere, **2018**;192:75-80.
- Streble** H, Krauter D. Atlas de los microorganismos de agua dulce: la vida en una gota de agua. Omega, **1987**:172-173.
- Terra** NR, Gonçalves SP. *Daphnia magna* Straus, 1820 response to sediment samples from a contaminated river (Rio Grande do Sul, Brazil). Acta Limnologica Brasiliensia, **2013**;25(1):19-33.
- Torok** B, Dransfield T, Schweitzer L, Noblet J. Water Contamination and Pollution. En: Green chemistry: an inclusive approach. Boston: Elsevier, **2017**:261-290.
- Torrentera** L, Tacon A. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura [monografía en internet]. Brasília: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, **1989** [consultado 14 julio 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S06.htm#chVI>
- Tyagi** VK, Chopra AK, Durgapal NC, Kumar A. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of municipal sewage treatment plant. Journal of Applied Sciences and Environmental Management, **2007**;11:61-67.
- Wang** L, Ji B, Hu Y, Liu R, Sun W. A review on in situ phytoremediation of mine tailings. Chemosphere, **2017**;184:594-600.
- Wang** P, Ng QX, Zhang H, Zhang B, Ong CN, He Y. Metabolite changes behind faster growth and less reproduction of *Daphnia similis* exposed to low-dose silver nanoparticles. Ecotoxicology and environmental safety, **2018**;163: 266-273.
- Yabe** J, Nakayama SM, Ikenaka Y, Yohannes YB, Bortey-Sam N, Kabalo AN, Ntapisha J, Mizukawa H, Ishizuka M. Lead and cadmium excretion in feces and urine of children from polluted townships near a lead-zinc mine in Kabwe, Zambia. Chemosphere, **2018**;202:48-55.
- Yuan** S, Li H, Dang Y, Liu C. Effects of triphenyl phosphate on growth, reproduction and transcription of genes of *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology, **2018**;195:58-66.

**Zheng** L, Liu Z, Yan Z, Yi X, Zhang, J, Zhang Y, Zheng X, Zhu, Y. Deriving water quality criteria for trivalent and pentavalent arsenic. *Science of the Total Environment*, **2017**;587:68-74.

**Zhu** X, Yang J, Xu N, Chen G, Yang Z. Combined effects of nitrogen levels and *Daphnia* culture filtrate on colony size of *Scenedesmus obliquus*. *Algal Research*, **2015**;9:94-98.