



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**“ANÁLISIS DE LA TOLERANCIA AL PLOMO DE *Daphnia*
spp. (PULGA DE AGUA) PROCEDENTE DEL LAGO YAHUARCOCHA”**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO/A EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORA:

María Vanessa Figueroa González

DIRECTORA:

Ing. Elizabeth Velarde

Ibarra – Ecuador

2020

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

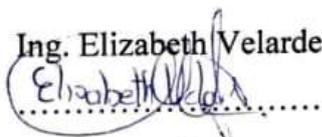
**“ANÁLISIS DE LA TOLERANCIA AL PLOMO DE *Daphnia*
spp. (PULGA DE AGUA) PROCEDENTE DEL LAGO YAHUARCOCHA”**

Trabajo de Titulación revisado por la Directora y Comité Asesor, por lo cual se
autoriza su presentación como requisito parcial para obtener el Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

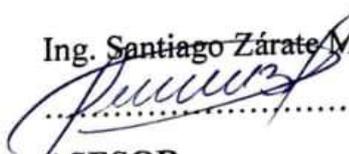
APROBADA:

Ing. Elizabeth Velarde MSc



DIRECTORA

Ing. Santiago Zárate MSc



ASESOR

Ing. Carla Sandoval MSc



ASESORA



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	0401892302		
APELLIDOS Y NOMBRES:	FIGUEROA GONZÁLEZ MARÍA VANESSA		
DIRECCIÓN:	Imbabura, Pimampiro, Rio Escudillas y Bolívar		
EMAIL:	vanessafigieroa15 @live.com		
TELÉFONO FIJO:	-	TELÉFONO MÓVIL:	0992689537

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	ANÁLISIS DE LA TOLERANCIA AL PLOMO DE <i>Daphnia.spp</i> (PULGA DE AGUA) PROCEDENTE DEL LAGO YAHUARCOCHA
AUTOR (ES):	FIGUEROA GONZÁLEZ MARÍA VANESSA
FECHA: DD/MM/AAAA	27 de febrero de 2020
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Elizabeth Velarde, MSc.

2. CONSTANCIAS

El autor (es) manifiesta (n) que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y que es (son) el (los) titular (es) de los derechos patrimoniales, por lo que asume (n) la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá (n) en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 27 días del mes de febrero de 2020

EL AUTOR:

(Firma) 
Nombre: FIGUEROA GONZÁLEZ MARÍA VANESSA

2. CONSTANCIAS

La autora manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros; por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 04 días de marzo del 2020

LA AUTORA:



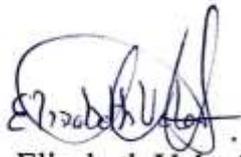
María Vanessa Figueroa González

C.I. 0401892302

CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la Srta. María Vanessa Figueroa González, bajo mi supervisión.

Ibarra, a los 04 días de marzo del 2020



Ing. Elizabeth Velarde MSc

DIRECTORA DE TESIS



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

DEL TRABAJO DE GRADO A FAVOR

DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

Yo, María Vanessa Figueroa González, con cédula de identidad Nro.040189230-2, manifiesto mi voluntad de ceder a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de Propiedad Intelectual del Ecuador, artículos 4, 5 y 6, en calidad de autor de la obra o trabajo de grado denominado: "ANÁLISIS DE LA TOLERANCIA AL PLOMO DE *Daphnia* spp. (PULGA DE AGUA) PROCEDENTE DEL LAGO YAHUARCOCHA", que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología en la Universidad Técnica del Norte, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.

María Vanessa Figueroa González

C.I. 040189230-2

PRESENTACIÓN

Yo, MARÍA VANESSA FIGUEROA GONZÁLEZ como autora de la Tesis Titulada **“ANÁLISIS DE LA TOLERANCIA AL PLOMO DE *Daphnia* spp. (PULGA DE AGUA) PROCEDENTE DEL LAGO YAHUARCOCHA”**, me hago responsable de los resultados, discusión, conclusiones y demás parte de la investigación; y pongo este documento como fuente de apoyo para consultas dirigidas a todos los estudiantes.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a mis padres por su apoyo incondicional, por su esfuerzo para permitirme culminar esta etapa primordial en mi vida. A mis hermanos Tamy y Lenin, por brindarme sus consejos cuando los he necesitado. Vivi, cuñada gracias por haber estado pendiente de mis necesidades durante mis estudios y ser una amiga y hermana más.

A todos los miembros del equipo LABINAM por su ayuda y conocimientos brindados durante el transcurso de esta investigación. En especial a: Ing. Elizabeth Velarde e Ing, Tania Oña por su constante colaboración.

Raúl Campos te agradezco por brindarme tu apoyo, cariño y darme fuerzas en todo momento. Ana Encarnación, amiga te agradezco por escucharme, brindarme tu ayuda y más que nada por sacarme una sonrisa en los peores momentos.

En general, a todas aquellas personas que guiaron mi camino durante el transcurso de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, tanto docentes como compañeros y amigos.

DEDICATORÍA

Este trabajo lo dedico a mi madre
Marlene González y a Dios, que
han sido mi soporte y guía en todo
momento.

Mis logros son tuyos MADRE.

Vanessa Figueroa

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE TABLAS	xvii
RESUMEN	xv
SUMMARY	xvi
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Revisión de literatura	3
Metales pesados.....	8
Plomo.....	9
Bioindicadores.....	9
<i>Daphnia</i>	9
1.2 Definición del problema y justificación	11
1.3 Pregunta(s) directriz (ces) de la investigación	14
1.4 Objetivos	14
1.4.1Objetivo general	
.....	14
1.5 Hipótesis	15
1.6 Marco legal	15
CAPÍTULO II	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.1 Caracterización del área de estudio	17

2.2 Cuantificación de parámetros fisicoquímicos y concentración de plomo en el lago Yahuarcocha.....	18
2.2.1 Identificación puntos de muestreo.....	19
2.2.2 Método de recolección de aguas para análisis de metales pesados .	19
2.2.3 Espectrofotometría de Absorción Atómica en muestras de agua del lago Yahuarcocha.....	20
2.3 Cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba	21
2.3.1 Colecta de individuos	22
2.3.2 Aclimatación de los organismos de prueba.....	23
2.3.3 Mantenimiento de los organismos de prueba.....	23
2.3.4 Preparación de agua reconstituida.....	24
2.3.5 Preparación de alimento para <i>Daphnia pulex</i>	26
2.4 Caracterización morfológica de cladóceros de la familia <i>Daphniidae</i>	26
2.5 Caracterización molecular de <i>Daphnia</i> spp.	27
2.5.1 Estandarización del protocolo de aislamiento de ADN a partir de muestras de tejido de <i>Daphnia</i> spp.	27
2.5.2 Cuantificación de ADN genómico por electroforesis	29
2.5.3 Estandarización del protocolo de aislamiento de ADN de <i>Daphnia</i> spp. de agua de acuario.....	29
2.5.4 Parámetros físico-químicos y validación <i>in silico</i> de cebadores específicos de <i>Daphnia pulex</i>	30
2.5.5 Estandarización de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con cebadores específicos de <i>Daphnia pulex</i>	32
2.6 Determinación de la concentración letal media CL₅₀₋₄₈ de plomo, y dicromato de potasio como tóxico de referencia.	32

2.6.1 Preparación de soluciones para análisis de toxicidad.....	33
2.6.1.1 Preparación de soluciones de Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$).	33
2.6.1.2 Preparación de soluciones de plomo (Pb)	33
2.6.1.3 Toma, preservación y diluciones de muestras ambientales del lago Yahuarcocha	34
2.6.2 Montaje de análisis de ecotoxicidad.....	34
2.6.2.1 Pruebas de sensibilidad con el tóxico de referencia dicromato de potasio	35
2.6.2.2 Pruebas de toxicidad para plomo (Pb)	36
2.6.2.3 Pruebas de toxicidad de la muestra de agua del lago Yahuarcocha	36
2.7 Análisis estadístico Probit y ANOVA.....	37
2.7.1 Análisis Probit y ANOVA de Dicromato de potasio	37
2.7.2 Análisis Probit y ANOVA de plomo	37
2.7.3 Análisis Probit y ANOVA de muestra ambiental	38
CAPÍTULO III	39
3. RESULTADOS.....	39
3.1 Cultivo de <i>Daphnia pulex</i>	39
3.2 Caracterización morfológica de <i>Daphnia</i> spp. del lago Yahuarcocha	41
3.3 Identificación molecular de <i>Daphnia</i> .spp del lago Yahuarcocha.....	42
3.3.1 Diseño y validación in <i>silico</i> de primers	42
3.3.2 Estandarización del ensayo de PCR para la identificación molecular de <i>Daphnia pulex</i>	43
3.4 Análisis de metales pesados del cuerpo de agua del lago Yahuarcocha.....	44

3.4.1 Concentración de Plomo	44
3.4.2 Parámetros físico-químicos	45
3.5 Determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₄₈) del dicromato de potasio, plomo y muestra ambiental, mediante bioensayos de ecotoxicidad acuática utilizando <i>Daphnia Pulex</i>	46
3.5.1 Pruebas de toxicidad para <i>Daphnia pulex</i>	46
CAPÍTULO IV	52
4. DISCUSIÓN	52
CAPÍTULO V	57
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
5.1 Conclusiones	57
5.2 Recomendaciones	61
BIBLIOGRAFÍA CITADA	62
ANEXOS	72

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Partes de <i>Daphnia.spp</i>	10
<i>Figura 2.</i> Mapa base del lago Yahuarcocha.....	17
<i>Figura 3.</i> (A) Muestras del agua del lago Yahuarcocha para análisis de metales pesados, (B) Medición de profundidad de la columna vertical de agua del lago para toma de muestras.....	20
<i>Figura 4.</i> Espectrofotómetro de absorción atómica	21
<i>Figura 5.</i> Colecta de muestras de zooplankton con red de 64 µm	22
<i>Figura 6.</i> (A) Cámara bioclimática, (B) Timer, (C) Luxómetro, (D) Termómetro	23
<i>Figura 7.</i> (A) Muestreo de agua en el lago (B) Muestreo en la entrada del lago (C) Traslado de muestras	34

<i>Figura 8.</i> Montaje pruebas de toxicidad	35
<i>Figura 9.</i> Reproducción de <i>Daphnia pulex</i>	40
<i>Figura 10.</i> Representación gráfica de la alineación del primer forward en la secuencia específica de la especie <i>Daphnia pulex</i>	43
<i>Figura 11.</i> Representación gráfica de la alineación del primer reverse en la secuencia específica de la especie.....	43
<i>Figura 12.</i> Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % teñido con SYBR Safe, donde se observan los resultados de PCR y se muestra amplificaciones de bandas de 500 pb a una temperatura de 56 °C con Gotaq Green master mix, usando muestras de tejido de <i>D.pulex</i>	44
<i>Figura 13</i> Mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> con dicromato de potasio. Líneas verticales corresponden a desviación estándar. Letras simbolizan rangos de significancia (Tukey α : 0.05)	47
<i>Figura 14</i> Mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> con plomo. Líneas verticales corresponden a desviación estándar. Letras simbolizan rangos de significancia (Tukey α : 0.05).....	49
<i>Figura 15</i> Mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> con muestra ambiental de punto profundo. Líneas verticales corresponden a desviación estándar. Letras simbolizan rangos de significancia (Tukey α : 0.05).....	50
<i>Figura 16</i> Mortalidad de <i>Daphnia pulex</i> con muestra ambiental del muelle. Líneas verticales corresponden a desviación estándar. Letras simbolizan rangos de significancia (Tukey α : 0.05).	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Límites permisibles de, plomo y mercurio según la tabla 3 de TULSMA ‘‘Criterios de Calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario</i>	16
Tabla 2 <i>Características del lago Yahuarcocha</i>	18
Tabla 3 <i>Puntos de muestreo</i>	19
Tabla 4 <i>Condiciones para el mantenimiento de cultivos</i>	24
Tabla 5 <i>Stock preparación agua reconstituida</i>	25
Tabla 6 <i>Control de parámetros</i>	25
Tabla 7 <i>Características físico-químicas de los cebadores</i>	31
Tabla 8 <i>Registro de neonatos</i>	40
Tabla 9 <i>Características dicotómicas descriptivas</i>	41
Tabla 10 <i>Características dicotómicas numéricas</i>	42
Tabla 11 <i>Concentración de Plomo (Pb) en los diferentes puntos de muestreo del lago Yahuarcocha</i>	45
Tabla 12 <i>Parámetros físico-químicos</i>	45
Tabla 13 <i>Carta de control de prueba de sensibilidad</i>	46
Tabla 14 <i>Carta control de plomo</i>	48
Tabla 15 <i>Carta control de muestra ambiental (punto profundo)</i>	49
Tabla 16 <i>Carta control de muestra ambiental (muelle)</i>	50

RESUMEN

Las diversas actividades humanas contaminan los ecosistemas acuáticos, alterando su ecología. El uso de bioensayos permite evaluar los efectos de los tóxicos sobre los organismos que habitan en los ecosistemas. En la presente investigación se desarrolló bioensayos de toxicidad aguda en condiciones experimentales específicas y controladas. A fin de determinar la concentración que inmoviliza el 50% de la población de *Daphnia pulex* en un periodo de 48 horas (CL₅₀₋₄₈) sometidas a dicromato de potasio, plomo y muestra ambiental del lago Yahuarcocha. Se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de la especie de *Daphnia* que habita en el lago, con el fin de corroborar las técnicas morfológicas. Mediante el empleo de cebadores específicos de *Daphnia pulex*, los resultados de estandarización de la PCR mostraron una alta especificidad de los cebadores “*D. pulex* 1498 Fw/Rv” que amplificaron una banda de 500 pb en el 100% de las muestras. Además con el objetivo de conocer los niveles de concentración de plomo en Yahuarcocha para tomarlos como punto de partida en la investigación se analizaron muestras de agua del lago. En base a los análisis físico-químicos todas las muestras rebasaron los límites permitidos para plomo según la norma TULSMA; el muelle (0.30 mg/l) presentó un nivel de concentración más alto, seguido de la planta de tratamiento (0.18 mg/l) y el punto profundo (0.14 mg/l). Una vez concluida la investigación se establecieron los rangos de CL₅₀ de dicromato de potasio 0.45 ppm, así como la CL₅₀ de plomo 0.25 ppm, y la CL₅₀ de la muestra ambiental obtenidas del punto profundo 55.19% V/V y del muelle 37.83 % V/V.

PALABRAS CLAVES: Pruebas de toxicidad, concentración letal media en cuarenta y ocho horas (CL₅₀₋₄₈), plomo (Pb), *Daphnia pulex*, reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

SUMMARY

The diverse human activities pollute aquatic ecosystems, altering their ecology. The use of bioassays allows to evaluate the effects of toxins on the organisms that inhabit the ecosystems. In the present investigation, bioassays of acute toxicity were developed under specific and controlled experimental conditions. In order to determine the concentration that immobilizes 50% *Daphnia pulex*'s population population in a period of 48 hours (CL50-48) subjected to potassium dichromate, lead and environmental sample of Lake Yahuarcocha. The polymerase chain reaction (PCR) was used to identify the species of *Daphnia* that lives in the lake, in order to corroborate the morphological techniques. Using specific *Daphnia pulex* primers, PCR standardization results showed high specificity of *D. pulex* 1498 Fw/Rv primers that amplified a 500 bp band in 100% of the samples. With the objective of know the concentration levels of lead, mercury and zinc in Yahuarcocha to take them as a starting point in the investigation, water samples from the lake were analyzed. Based on the physical-chemical analyzes, all -samples exceeded the permitted limits for lead according to the TULSMA standard; the pier (0.30 mg/l) had a higher concentration level, followed by the treatment plant (0.18 mg/l) and the deep site (0.14 mg/l). Once the investigation was concluded, the ranges of LC50 of potassium dichromate 0.45 ppm were established, as well as the LC50 of lead 0.25 ppm, and the LC50 of the environmental sample obtained from the deep point 55.19% V/V and the lake spring 37.83 % V/V.

KEYWORDS: Toxicity tests, median lethal concentrations in forty-eight hours (LC50-48), lead (Pb), *Daphnia pulex*, polymerase chain reaction (PCR)

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación industrial, agropecuaria, minera y el uso indiscriminado de fertilizantes químicos que se incorporan finalmente a sistemas acuáticos alteran la sostenibilidad de la cadena trófica, provocando riesgos potenciales en la naturaleza (Londoño, Londoño, & Muñoz, 2016). Estas actividades antropogénicas, han generado un incremento de metales en los ecosistemas acuáticos (Gutierrez & Gagnetten, 2011). Los metales pesados representan una amenaza para el ambiente y para los organismos que habitan en él; debido a que no son biodegradables, acumulándose en los tejidos y órganos (Hidalgo & Osorio, 2013).

Metales como sodio (Na), potasio (K), calcio (Ca), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn) y zinc (Zn) denominados iones esenciales cumplen un papel fundamental en el metabolismo de humanos y animales en pequeñas cantidades. Otros metales como plomo (Pb), vanadio (V), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y arsénico (As), no poseen actividad biológica y son denominados iones tóxicos aun en bajas concentraciones (Senior, 2016; Sharma, 2014). La toxicidad de los metales en los organismos puede tener efectos letales a largo o a corto plazo y efectos subletales que incluyen cambios en el crecimiento, desarrollo, reproducción y comportamiento (Agudelo, Gaviria, Barrios, & Cardona, 2018).

La ecotoxicología ha permitido predecir los efectos adversos generados en la salud humana y en los organismos acuáticos a través de bioensayos de detección, control y monitorización de los contaminantes que se encuentran en el entorno, permitiendo

determinar el nivel de exposición de los organismos (Santana, 2014). Los bioensayos de toxicidad permiten prevenir y controlar la contaminación en ecosistemas acuáticos, determinan el potencial toxicológico de cualquier sustancia fisiológicamente activa (Gutierrez & Gagneten, 2011).

Las pruebas de toxicidad se utilizan para evaluar los efectos de un contaminante en organismos vivos o también llamados bioindicadores, en condiciones establecidas y reproducibles (Agudelo et al., 2018) Dentro de los ecosistemas acuáticos, el zooplancton cumple un rol importante en las tramas tróficas, además poseen una elevada sensibilidad a los cambios físicos y químicos, estas características los hacen adecuados para su utilización como bioindicadores de contaminación por metales (Gutierrez & Gagneten, 2011).

Dentro del zooplancton, destacan los individuos del género *Daphnia* por características como facilidad de cultivo en el laboratorio, reproducción partenogénica, corto ciclo de vida con un elevado número de crías, alta sensibilidad a tóxicos, extensa distribución geográfica. Pueden alimentarse de algas y mejorar la calidad de aguas (Wang, Zhang, Den, Zhang, & Peng, 2016). Además, el importante rol que desempeñan al interior de la comunidad zooplanctónica, han hecho a este grupo de organismos ideal para la evaluación de la toxicidad (Díaz-Báez, López, & Ramírez, 2004). Así por ejemplo, Garcés, 2013 en su investigación empleó bioensayos de toxicidad para determinar los niveles de toxicidad en el agua de una vertiente, aplicando *Daphnia magna* como indicador biológico (Garcés, 2013).

Individuos del género *Daphnia* se han utilizado ampliamente como bioindicadores de la calidad de aguas en diferentes investigaciones tales como: Gamez & Ramirez, (2008); Vargas & Perea, (2011); Velandia & Montañez, (2010), entre otras. La presente investigación busca evaluar la sensibilidad de organismos *Daphnia* spp. que habitan el lago Yahurcocha mediante su exposición a plomo (Pb) empleando pruebas de toxicidad aguda, para lo cual se establecieron los índices de efecto tóxico del metal plomo como referente debido a su incidencia en el lago Yahuarcocha.

1.1 Revisión de literatura

Los ensayos biológicos permiten determinar el efecto tanto de agentes físicos como químicos sobre organismos de prueba en condiciones específicas y controladas (Castillo, 2004). Los organismos usados en los ensayos de ecotoxicidad deben encontrarse en perfectas condiciones de salud, serán previamente aclimatados, y se mantendrán en condiciones ambientales constantes (Velandia & Montañez, 2010).

En los ensayos de ecotoxicidad aguda se han empleado larvas y juveniles de peces (tilapia, carpa) como bioindicadores. Técnica que se basa en exponer a los peces a compuestos tóxicos por un período de hasta 96 horas; registrando la mortalidad de los peces a las 24, 48, 72 y 96 horas, para calcular la concentración del compuesto tóxico que causa una mortalidad del 50 % de la población expuesta, misma que se denomina concentración letal media (CL₅₀) (Zapata & Pedrero, 2008).

El método puede ser realizado con diferentes especies de peces, como: tilapias (*Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mosambicus* o tilapias híbridas), carpas (*Ciprinus carpio*) y diferentes cíclidos como las mojarras (*Cichlasoma urophthalmus* y *Cichlasoma synspilum*) (Zapata & Pedrero, 2008). Estas especies se han seleccionado debido a que permiten mantener un stock poblacional, por ser de fácil manejo a nivel de laboratorio, y por ser especies de importancia ecológica (Villamarín, Chacón, & Álvarez, 2013).

Del mismo modo se han llevado a cabo bioensayos con plantas los cuales constituyen una excelente herramienta en la evaluación del riesgo ambiental y, en particular, la utilización de semillas de plantas vasculares es recomendada debido a su mayor sensibilidad (Pentreath, González, Barquín, Ríos, & Perales, 2015). En los ensayos de toxicidad se pueden emplear plantas acuáticas también denominadas macrófitas (Posada & Arroyave, 2006).

Fairchild, Ruessler, Haverland, & Carlson, (1997) compararon la sensibilidad de *Lemna minor* con la del alga *Selenastrum capricornutum*, donde obtuvieron

resultados variables, y pudieron determinar que ambas especies son altamente sensibles a las triacinas, las sulfonureas y las piridinas (Fairchild et al., 1997). Estudios con *Lemna minor* han determinado que es ideal para el estudio de la toxicidad acuática, porque son de fácil recolección y cultivo, además es sensible y sus bioensayos son económicos (Arroyave, 2004).

Asimismo se aplican métodos para la determinación de metales cuantitativamente como la espectrofotometría de absorción atómica en aguas naturales, potables y residuales, la cual se basa en la generación de átomos en estado basal y en la medición de la cantidad de energía absorbida por estos, la cual es directamente proporcional a la concentración de ese elemento en la muestra analizada (NMX-AA-087-SCFI, 2010).

La determinación cuantitativa y especiación de metales pesados a bajos niveles de concentración en muestras de carácter ambiental es necesaria debido a su toxicidad, ya que, a diferencia de los residuos orgánicos, los metales no se degradan y se acumulan en los suelos y sedimentos, por lo que afectan a los ecosistemas de forma prolongada (De la cruz, Alderete, & Laffón, 2013; Madrigal, Vázquez, Velasco, & Rodríguez, 2015).

Sin embargo, según Gutierrez y Gagneten, (2011) los mejores indicadores de contaminación en los sistemas acuáticos son los organismos que los habitan, entre los cuales se destacan aquellos organismos que conforman el zooplancton ya que son altamente sensibles a los cambios físicos y químicos, pudiendo ser utilizados como bioindicadores de contaminación por metales (Gutierrez & Gagneten, 2011) Se considera a los cladóceros representantes del zooplancton dulceacuícola, debido a que poseen altas tasas de reproducción, son fáciles de cultivar a nivel de laboratorio, tienen cortos ciclos de vida, reproducción asexual con cultivos monoclonales y sensibilidad a la presencia de sustancias contaminantes (Pérez, Garatachia, García, & Rubio, 2017).

Las especies de cladóceros más empleadas en pruebas de toxicología acuática son individuos del género *Daphnia*, siendo avaladas por diferentes agencias internacionales como: la protección ambiental de Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés), Sociedad Americana para la Evaluación y Materiales (ASTM, por sus siglas en inglés) y Norma mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010 (2011) (Pérez et al., 2017).

Los crustáceos de la familia *Daphniidae* utilizados como bioindicadores en pruebas de toxicidad representan gran parte del zooplancton en los grandes lagos, los cuales se encuentran rara vez en abundancia en lagos tropicales, sin embargo las especies que se encuentran presentes en este tipo de ecosistemas se caracterizan por ser de pequeño tamaño corporal (Lewis, 1996). Los microcrustaceos del género *Daphnia* comúnmente conocida como pulga de agua, son de cuerpo transparente lo que permite observar sus órganos internos. Se la encuentra en agua dulce distribuida ampliamente en lagos, reservorios artificiales, charcos temporales y pertenece a la clase branchiopoda, suborden cladócera (Velandia & Montañez, 2010).

En el XVIII Congreso de Investigación llevado a cabo en el Centro Universitario Anglo Mexicano Morelas, se dio a conocer un estudio cuyo objetivo fue comprobar la sensibilidad de *Daphnia magna* a los niveles de toxicidad de las aguas, donde según su hipótesis el porcentaje de mortalidad estaba directamente relacionado con los niveles de toxicidad de las aguas (Barrios et al., 2007). De igual manera distintas empresas utilizan esta técnica para evaluar la reducción de la toxicidad de sus efluentes, a través de la respuesta aguda (LC₅₀₋₄₈ horas) de *D. magna*, para posteriormente establecer el sistema de tratamiento biológico más efectivo (Gerrero, Rico, & Silva, 2017).

Científicos miembros de *Daphnia* Genomics Consortium (DGC) en el 2011 dieron a conocer su proyecto The Ecoresponsive Genome of *Daphnia Pulex*, investigación en la cual lograron interpretar el mapa genético de *Daphnia pulex*; registrando 200 Mb y al menos 30907 genes, es decir posee 8000 genes más que *Homo sapiens* como resultado de la duplicación de genes; casi 10000 genes de *Daphnia pulex* no

se han documentado en ningún otro organismo, siendo completamente nuevos para la ciencia (Colbourne et al., 2011).

Debido a su rápida multiplicación *Daphnia* acumula un sin número de mutaciones a través de generaciones. Según los investigadores *Daphnia* está evolucionando de manera muy rápida, duplicando genes a una velocidad que es 30 veces mayor a la de los humanos y 3 veces más alta que otros invertebrados. Los investigadores creen que este es un indicador de que *Daphnia* está respondiendo al estrés ambiental, provocado por contaminantes químicos de su entorno (Colbourne et al., 2011).

Por mucho tiempo *Daphnia* ha sido un organismo modelo en investigaciones de ecotoxicología acuática y éstos nuevos hallazgos sugieren que podría jugar un papel importante en la comprensión de cómo interactúan el genoma y el medio ambiente, abordando un área nueva de la ciencia denominada genómica ambiental (Colbourne et al., 2011).

En cuanto a la morfología de *Daphnia*, presenta un cuerpo ovalado, comprimido lateralmente, con un caparazón quitinoso bivalvo que recubre todo el cuerpo excepto las espinas caudales. La cabeza se halla levemente inclinada ventralmente, con un pico de forma variable denominado rostro que posee una anténula con sedas sensitivas apicales. Poseen generalmente entre 6 y 5 pares de apéndices aplanados mismas que tienen forma de hojas y cumplen con la función de filtrar alimento y además sirven de locomoción (Velandia & Montañez, 2010).

A cada lado se distinguen un par de antenas formadas por un segmento basal o basopodio, del cual se desprenden dos ramas: una dorsal con 4 o 3 artejos y una dorsal con 3 artejos, las cuales tienen funciones natatorias. Poseen un post-abdomen que desemboca en un par de uñas caudales, que en el margen posterior lleva espinas anales, marginales o laterales que colaboran en la limpieza de las patas e intervienen en la locomoción (Bernal & Rojas, 2007). Presentan un ojo compuesto mismo que orienta al animal mientras nada; en el dorso del cuerpo las hembras presentan la cámara de cría o de incubación en la cual incuban los huevos

partogénéticos o bien en ambientes hostiles se transforma en epifio albergando uno o dos huevos de resistencia (M. Jiménez, 2015).

Daphnia pulex presenta un tamaño corporal entre 1.1 a 3.5 mm de largo, un pecten medio robusto con 5-7 dientes, una vesícula óptica que toca el margen de la cabeza, casco liso y procesos abdominales densamente pubescentes, ésta característica la separara de las demás especies excepto de *Daphnia pulicaria* ya que presenta características similares (Witty, 2004).

Además, la PCR permite a nivel *in vitro* obtener millones de copias idénticas a partir de un fragmento específico de ADN, en poco tiempo y sin necesidad de usar células vivas (Curtis, 2008). La cantidad de ADN usada puede ser pequeña, ya que la PCR solamente trabaja con una molécula inicial aislada. Para el inicio de síntesis de ADN se requieren un par de cebadores o primers, cada uno complementario a las cadenas de ADN llevada a cabo por la Taq Polimerasa (Brown, 2008). La síntesis de la cadena complementaria utiliza el principio de la ADN polimerasa en dirección 3'-5' a partir de una secuencia diana (Gutiérrez, 2006). Para el aislamiento de ADN de *Daphnia* se usa diferentes kits de purificación de ADN, siendo MasterPure™ (Epicentre, Madison, WI, EE.UU.) el más eficiente para *Daphnia*. (Athanasio, Chipman, Viant, & Mirbahai, 2016).

A fin de determinar la taxonomía de diferentes especies como *Daphnia* se han utilizado herramientas moleculares, la secuencia y estructura de los genomas mitocondriales se ha empleado para estudiar las relaciones filogenéticas de taxones animales. Todos los animales metazoos poseen su propio genoma mitocondrial circular con dos cadenas que varían de 14 kb a 42 kb de longitud. Estos típicamente codifican 37 genes: 2 genes de ARNr (16S rRNA y 12S rRNA), 22 genes de tRNA y 13 genes que codifican proteínas (COI, COII, COIII, Cytb, ATP6, ATP8, ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND). Además, la región no codificante (también llamada región de control o D-loop), que posee funciones en la regulación e iniciación de la transcripción y replicación del ADN mitocondrial. Las secuencias completas del genoma mitocondrial brindan mayor información que las secuencias

más cortas de genes individuales, además proporcionan un conjunto de caracteres genómicos (Geng et al., 2016). Según Geng et al., (2016) el genoma mitocondrial de *Daphnia pulex* es una molécula circular de 15306 pb de tamaño. Posee 13 genes codificadores de proteínas (*ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6, ND4L, COI, COII, COIII, Cytb, ATP6, ATP8*), 22 genes de ARNt, 2 genes de ARNr para las subunidades pequeñas y grandes (*rrnS* y *rrnL*) y una región de control putativo. El gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) es principal subunidad del complejo C oxidasa (complejo proteico transmembrana). Se halla en bacterias y en la membrana de eucariotas, en la cadena de electrones respiratorios es la última enzima y se emplea a menudo como un código de barras de ADN para identificar especies animales, presenta variación de la secuencia entre especies del mismo género (Daza, 2018).

A continuación se da a conocer la conceptualización básica para abordar el tema de investigación:

Metales pesados

Los metales pesados en el medioambiente pueden tener un origen natural o antropogénico (Martorell, 2010). Las actividades petroleras, agrícolas e industriales, así como actividades urbanas y sanitarias han incrementado la cantidad de metales pesados en el medio acuático (Cruz, 2013). Los metales pesados una vez ingresados en la columna de agua se encuentran de forma disuelta, coloidal y adherida a la materia orgánica que se halla suspendida o en los sedimentos (Cruz, 2013). Cuando los metales pesados se encuentran en los sedimentos son ingeridos por los organismos de los estratos más bajos como fitoplancton y organismos filtradores (Márquez et al., 2008). La problemática aumenta debido a que los metales no son biodegradables y pueden bioacumularse en los organismos (Sharma, 2014). La acumulación de éstos tóxicos en los organismos permite su transferencia a lo largo de la cadena trófica (United Nations, 2005). Además, algunos compuestos de éstos metales se transforman en otros de muy diferente toxicidad cuando se combinan con otros elementos (Contreras & Molero, 2011).

Plomo

El plomo es un metal pesado no biodegradable, no esencial en el organismo de individuos y altamente tóxico para los organismos aun en bajas concentraciones (Verma & Choudhary, 2017). El plomo se encuentra de forma natural formando parte de la corteza terrestre. Otras fuentes de plomo son las emisiones industriales de fusión de metales, humo de tabaco, forman parte de baterías, tuberías, proyectiles y revestimientos de cables (Hernández, 2009). El plomo puede llegar hasta fuentes de agua a través de la corrosión de tuberías de plomo y corrosión de pintura (Velandia & Montañez, 2010). Una vez que el plomo se encuentra en sistemas acuáticos se acumula en sedimentos los cuales son ingeridos por el zooplancton, mismos que experimentan envenenamiento aun en bajas concentraciones de plomo. De ésta manera ingresa a la cadena alimenticia por bioacumulación. Además, las funciones del fitoplancton pueden verse alteradas cuando estos entran en contacto con plomo (Velandia & Montañez, 2010). La forma como se halla el plomo en el ambiente influye en su potencial de absorción y toxicidad en los organismos acuáticos. Además las condiciones físico-químicas como temperatura, pH, contenido de ácidos fúlvicos y húmicos también influyen en la bioacumulación de plomo a partir de agua y sedimentos (Hernández, 2009).

Bioindicadores

Son aquellos organismos o comunidades en los que sus características estructurales, su existencia, su funcionamiento y reacciones, obedecen al medio que los rodea o en el cual se desarrollan y cambian en base a la variación de las condiciones ambientales. Son sensibles a los cambios ambientales y reaccionan a los mismos, mediante respuestas que indican los cambios ocurridos y el nivel de intensidad del cambio ambiental (Martí, 2007).

Daphnia

Los micro crustáceos de agua dulce como los cladóceros, principalmente las diferentes especies del género *Daphnia*, se utilizan en el monitoreo y control ambiental de sustancias tóxicas a nivel mundial (Díaz-Báez et al., 2004). *Daphnia*

es un organismo muy complejo ya que en presencia de depredadores modifica su morfología, desarrollando pequeñas protuberancias en la cabeza (Figura 1). Tiene la capacidad de desarrollarse en un sin número de hábitats acuáticos; son sensibles a los tóxicos modernos del medio ambiente y cambia su reproducción entre clonal y sexual en respuesta a las condiciones ambientales (Colbourne, Singan, & Gilbert, 2005).

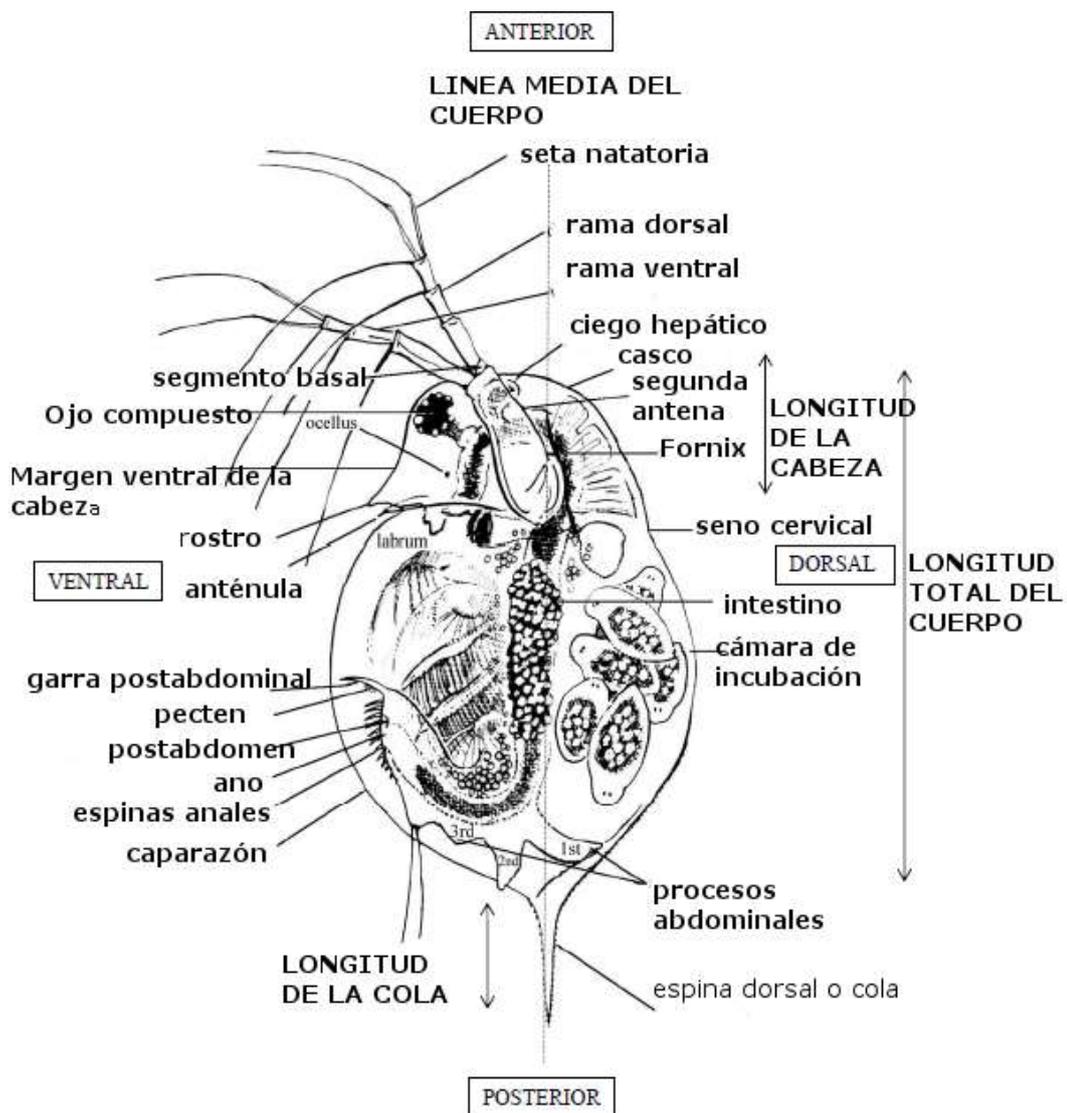


Figura 1. Partes de *Daphnia*.spp

1.2 Definición del problema y justificación

La contaminación de sistemas acuáticos se ha convertido en un problema visible y cotidiano (Isch, 2011). Las diferentes actividades industriales, así como las aguas servidas que se arrojan desde las ciudades sin ningún tratamiento, son las fuentes de contaminación más notables. A esto se incrementa la convivencia con animales de pastoreo cerca de las fuentes, lo cual ha causado un incremento de metales en los ecosistemas acuáticos (Gutierrez & Gagnetten, 2011). Además, algunos compuestos de éstos metales se transforman en otros de muy diferente toxicidad (Contreras & Molero, 2011).

Se considera a los metales pesados como los contaminantes más graves para los sistemas acuáticos, ya que a diferencia de los contaminantes orgánicos no se eliminan por procesos naturales. Sino que por su parte, se integran a la cadena alimenticia por medio de procesos de bioacumulación, bioconcentración o biomagnificación (Rivera et al., 2005). La acumulación de éstos tóxicos en los organismos permite su transferencia a lo largo de la cadena trófica, dando como resultado un aumento en la concentración del contaminante en los organismos de los más altos niveles de la cadena alimenticia (United Nations, 2005). Además, los metales tóxicos tienden a acumularse en los sedimentos donde se convierten en formas químicas biodisponibles, para más tarde resuspenderse en la columna de agua provocando intoxicaciones crónicas o agudas (Rivera et al., 2005).

Los metales pesados en su forma iónica son incorporados con facilidad por los organismos a sus tejidos, aumentando las posibilidades de oxidación y retención por los órganos. Una vez enlazados a proteínas y macromoléculas celulares interfirieren en reacciones enzimáticas con una baja movilidad, lo cual provoca que se acumulen modificando el metabolismo del organismo (Hernández, 2009). Los metales pesados una vez introducidos en el ambiente pueden permanecer ahí por cientos de años; lo que produce un daño grave al ecosistema acuático, ya que puede causar alteraciones genéticas en plantas, animales o microorganismos, además de generar efectos negativos gracias a su toxicidad (D. Jiménez, 2012).

El más importante por su abundancia es el plomo que está presente en las cañerías de plomo, pintura de plomo usada ampliamente especialmente en utensilios de cocina, una tercera fuente es la gasolina que antes se la usaba con plomo ahora ya se lo ha eliminado (Eróstegui, 2009). Además plaguicidas contienen plomo siendo éste un contaminante persistente (Orta, 2002). En los organismos acuáticos los efectos del plomo incluyen alteraciones del crecimiento, reproducción, comportamiento, metabolismo y sobrevivencia. En *D. magna* cuando el metal ingresa al organismo casi el 90% es absorbido por su exoesqueleto (Gutierrez & Gagnetten, 2011).

Se han desarrollado métodos de análisis ambiental de aguas, con la finalidad de determinar el grado de contaminación del ambiente. Sin embargo, los análisis fisicoquímicos tienen costos elevados, no representan de manera real el impacto de los contaminantes en el ambiente y sobre todo no nos permiten identificar los efectos que dichos contaminantes provocan en el organismo de los animales y humanos (Garcés, 2013). Por su parte, los ensayos de ecotoxicidad permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos sobre los organismos (Díaz-Báez et al., 2004).

Diferentes especies del género *Daphnia* se han empleado en pruebas de toxicidad tales como *D. magna*, *D. pulex*, *D. reticulata* y *D. obtusa*. Sin embargo, la facilidad de manejo y el considerable tamaño de los neonatos ha hecho a *Daphnia magna* la más utilizada en pruebas de ecotoxicidad (Díaz-Báez et al., 2004). Individuos del género *Daphnia* spp. se han utilizado ampliamente como bioindicadores de la calidad aguas en diferentes investigaciones tales como: Velandia & Montañez, (2010), Gamez & Ramirez, (2008), Vargas & Perea, (2011), entre otras.

En febrero del 2003 se registró la muerte masiva de peces en el lago Yahuarcocha, donde el Instituto Nacional de Pesca determinó que los parámetros físico-químicos en la columna de agua y sedimentos registrados se encontraban dentro de los rangos

normales para cuerpos lóaticos. Sin embargo, las especies abundantes del lago indicaron una alteración en la calidad del agua (Maridueña et al., 2011).

Por otra parte Malitaxi en su investigación realizada en el 2016, determinó que la concentración de plomo (Pb) y cadmio (Cd) tanto en músculo como en hígado de tilapia sobrepasaba los límites permisibles permitidos por la norma INEN 0183. En este mismo estudio, las concentraciones de plomo y cadmio en el agua del lago sobrepasaron los límites permitidos por la normativa de calidad ambiental TULSMA, catalogándolas no aptas para la preservación de flora y fauna (Malitaxi, 2016). Además, el Instituto Nacional de Pesca (INP) realizó un estudio del cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) introducido en el lago Yahuarcocha, indicando la presencia de cantidades de plomo, mercurio y cadmio en concentraciones considerables en la musculatura de los animales (El Universo, 2014).

Así como también Terneus en el 2014 realizó un estudio en el lago Yahuarcocha con la finalidad de determinar el estado trófico del lago, para lo cual evaluó las características fisicoquímicas del mismo. Donde se pudo observar altas concentraciones de macronutrientes (Ca, Na, Fe, Mg y K) y presencia de plomo en Yahuarcocha por encima del límite permisible para la preservación de flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario establecidas por TULSMA (Terneus, 2014). De igual manera en el lago se descarga aguas servidas de los domicilios aledaños y residuos de actividades que se desarrollan en los alrededores del lago sin tratamiento previo en las áreas donde crece colla y totora (Lara, 2015).

Debido a esto, se cree que las aguas del lago contienen metales como arsénico, cadmio, plomo, zinc y estaño, perjudiciales para la salud tanto en animales como en seres humanos. A pesar de estos reportes previos, hasta el momento no se ha realizado un estudio detallado sobre los niveles de ecotoxicidad de este ecosistema acuático del lago, lo que dificulta entender el actual estado del lago y los potenciales riesgos con los ecosistemas colindantes.

Por lo cual ésta investigación busca analizar mediante ensayos de ecotoxicidad el estado del lago. El presente estudio forma parte del proyecto ‘Pilot study on DNA-based biomonitoring in the Amazon River Basin’ del programa VLIR-OUS dedicado a la investigación en el campo del control biológico basado del ADN conformado entre la Universidad Técnica del Norte y la cooperación Belga VLIR.

La información que se genere acerca de los ensayos de ecotoxicidad del Lago Yahuarcocha constituirá una herramienta importante para el análisis del funcionamiento de este ecosistema acuático. Asimismo, en el establecimiento de pautas de manejo que junto a un trabajo coordinado entre las entidades correspondientes se puede llegar al mejoramiento o conservación de las condiciones de los lagos en estudio.

Contribuyendo de igual manera con los resultados del presente proyecto en el cumplimiento del objetivo siete del Plan Nacional del Buen Vivir, que es “Garantizar los derechos de la naturaleza y promover la sostenibilidad ambiental territorial y global” (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo, 2013).

1.3 Pregunta(s) directriz (ces) de la investigación

- ¿La utilización del microcrustáceo *Daphnia* spp. aportará a la incorporación de nuevos bioensayos de toxicidad para determinar dosis letales por metales pesados en el agua para asegurar su uso por la población en el sector
- ¿Cuál es la concentración letal media por plomo para *Daphnia* spp.?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la sensibilidad de los organismos *Daphnia* spp. que habitan el lago Yahuarcocha mediante su exposición a plomo (Pb).

1.4.2 Objetivos específicos

- Cuantificar parámetros fisicoquímicos y concentración de plomo en el lago Yahuarcocha.
- Caracterizar morfológicamente y molecularmente la especie *Daphnia* spp. del lago Yahuarcocha.
- Determinar la concentración letal media CL_{50-48} de plomo y dicromato de potasio como tóxico de referencia.

1.5 Hipótesis

El microcrustáceo *Daphnia* spp. del lago Yahuarcocha es factible de utilizar en pruebas de ecotoxicidad a plomo.

1.6 Marco legal

La presente investigación se enmarca dentro de distintos instrumentos legales que van desde la Constitución de la República, leyes nacionales hasta leyes municipales. En la Constitución de la República del Ecuador (2008), dentro del *Título II- Régimen del Buen Vivir, Capítulo II- Biodiversidad y Recursos Naturales, Sección VI-Agua*, se señala que el estado garantizará la conservación, recuperación y manejo integral del recurso hídrico en sus diferentes formas. De igual forma regulará la cantidad y calidad del agua, así como el equilibrio de los ecosistemas. Lo cual orienta a la presente investigación al estudio sobre los niveles de ecotoxicidad del ecosistema acuático del lago Yahuarcocha, a fin de entender el actual estado del lago y los potenciales riesgos con los ecosistemas colindantes.

Ley Orgánica del Régimen Municipal Ibarra Vigente Año 2009, artículo 69, numeral 31. Señala que se deben tomar medidas de carácter urgente sobre la cuenca hidrográfica de la Laguna de Yahuarcocha ya que se halla en peligro grave de destrucción a causa de la mala práctica turística, agresión ecológica, impacto

negativo del ecosistema y falta de conciencia urbanística; provocando contaminación del hábitat acuático, extinción de peces, aves y especies vegetales. La Municipalidad de Ibarra posee un estudio “Plan Integral de Yahuarcocha” que data del año 1983, el mismo que a la fecha ya es desactualizado. Por lo cual ésta investigación busca contribuir a la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad, la integridad del patrimonio genético y urbanístico de la zona, mediante el análisis de la sensibilidad de *Daphnia* del lago Yahuarcocha para posteriormente aplicar un plan de prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados.

Por su parte el Texto unificado de legislación secundaria del ministerio del ambiente 2009. En el Libro IV- Anexo 1: “Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: recurso agua”. Nos provee de los límites permisibles para descargas en cuerpos de agua o sistemas de alcantarillado, así como los criterios de calidad de las aguas para sus distintos usos. Lo cual nos permite tener una guía para determinar la presencia de contaminantes en el agua para la prevención y control de la contaminación ambiental, En Tabla 1 la podemos encontrar los límites permisibles para los principales el metal en estudio

Tabla 1

Límites permisibles de, plomo y mercurio según la tabla 3 de TULSMA “Criterios de Calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario

Parámetros	Metales	Unidad	Límites		
			Agua dulce	fría	Agua cálida dulce Agua marina y de estuario
Plomo	Pb	mg/l	0.01		0.01

Fuente: Tulsma (2009)

La cuenca de drenaje ocupa 2530 ha, exhibe una forma alargada y se halla entre los 2200 a 3600 msnm. Yahuarcocha se alimenta de manera natural, por los caudales provenientes de sus tres principales entradas, las Quebradas de Manzanohuayco-Santo Domingo, Polo Golo y San Antonio, con un régimen hídrico intermitente, secándose durante la época de estiaje en verano. Además, ingresa un cuadal permanente a través de un canal proveniente del río Tahuando, existe un desagüe artificial construido para permitir el manejo de los niveles de agua del lago (Maridueña et al., 2011). La Tabla 2 muestra las principales características del lago Yahuarcocha.

Tabla 2

Características del lago Yahuarcocha

Temperatura máxima (promedio anual °C)	24.00
Temperatura mínima (promedio anual °C)	12.00
Precipitación anual (mm)	750
Profundidad máxima (m)	6.50
Máxima altitud de la cuenca (msnm)	3820
Área del lago (km ²)	2.61
Área de la cuenca (km ²)	23.71
Área urbana (%)	6.00
Máxima altitud de la cuenca (msnm)	3820
Páramo (%)	1.64
Plantaciones (%)	1.86

Fuente: Blomme, (2014); Mandonx, (2014); Maridueña et al., (2011)

2.2 Cuantificación de parámetros fisicoquímicos y concentración de plomo en el lago Yahuarcocha

La metodología de absorción atómica se empleó para medir los niveles de concentración del metal pesado plomo en el lago Yahuarcocha mediante el método de Absorción Atómica.

2.2.1 Identificación puntos de muestreo

A fin de recolectar muestras significativas de una amplia área de la cuenca hidrográfica, se establecieron los siguientes puntos de muestreo: muelle de lanchas, planta de tratamiento y punto profundo (Tabla 3). Los puntos se seleccionaron en base a investigaciones previas realizadas en el lago Yahuarcocha por investigadores tales como Cabrera, (2015); Caicedo, (2015); Portilla, (2015).

Tabla 3

Puntos de muestreo

Nº	Referencia	Coordenadas
1	Muelle nuevo	822250;10041602
2	P.Tratamiento	823043;1004074
3	P.Profundo	822290;10040688

2.2.2 Método de recolección de aguas para análisis de metales pesados

El muestreo se realizó en base a la normativa mexicana NMX-AA-051-SCFI, (2016). Para lo cual se recolectó muestras de agua en envases de polietileno limpios, los cuales previo a la recolección, se los homogenizó con agua del lago y posteriormente se los rotuló. Se utilizó una red cónica de 64 μm , obteniendo 100 ml en un vaso recolector, a fin de conseguir una muestra compuesta representativa de la zona, se tomó cuatro muestras de 100 ml a diferentes profundidades por punto.

En el punto profundo se tomó muestras a una profundidad de 2m, 3m, 4m y 5m ya que la profundidad de toda la columna de agua es de 6 m y 0.60 cm en este punto. En la planta de tratamiento se tomó las muestras a una profundidad de 0.30 cm, 0.60 cm, 0.90 cm y 1m con 0.20 cm ya que la profundidad total aproximada es de 1 m con 0.80 cm. Finalmente en el muelle se tomó muestras a una profundidad de 0.50 cm, 1m, 2m y 3m tomando en cuenta que la profundidad total aproximada en este punto es de 3 m y 0.60 cm. De modo que en primer lugar se midió la profundidad de la columna vertical de agua del lago en cada punto, con un medidor de

profundidad y posteriormente se tomó las muestras desde la superficie hacia el fondo (Figura 3). Los ejemplares se transportaron en refrigeración, con el fin de evitar la alteración de los parámetros por calor.



Figura 3. (A) Muestras del agua del lago Yahuarcocha para análisis de metales pesados, (B) Medición de profundidad de la columna vertical de agua del lago para toma de muestras.

2.2.3 Espectrofotometría de Absorción Atómica en muestras de agua del lago Yahuarcocha

El análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Análisis Físico-Químicos y Microbiológicos de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte. El análisis de concentración de plomo (Pb) se realizó mediante un método espectrofotométrico, empleando un espectrofotómetro de Absorción Atómica (Marca PerKin Elmer, MODELO AAnalyst 400 AA) (Figura 4).



Figura 4. Espectrofotómetro de absorción atómica

La cuantificación se llevó a cabo mediante el programa de cómputo denominado WinLab32 AA Flame. Finalmente la cantidad de metales pesados se comparó con la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua. Libro VI, Anexo I, Tabla 3. Criterios de calidad para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, aguas marinas y de estuario (TULSMA, 2015).

1.3 Cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba

Los parámetros requeridos para el mantenimiento de los organismos fueron controlados en base a protocolos internacionales: Asociación Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 12713, (2016), United States Environmental Protection Agency (EPA-821-R-02-012, 2002), International Standard Organization (ISO 6341, 2012), Normativa Mexicana (NMX-AA-087-SCFI, 2010), Compañía de Tecnología de Saneamiento Ambiental (CETESB L5.018, 1994), validados para ensayos de ecotoxicidad y mantenimiento de individuos.

1.3.1 Colecta de individuos

Los organismos usados en los ensayos de ecotoxicidad fueron *Daphnia* spp. del lago Yahuarcocha, recolectados del lago siguiendo la metodología propuesta por Cabrera, (2015); Caicedo, (2015); Portilla, (2015). La localización de las coordenadas de los diferentes puntos de muestreo de los individuos en el lago Yahuarcocha se fijó con GPS Garmin 62SC, posterior a la ubicación del punto se midió la extensión entre el fondo y la superficie del agua con el medidor de profundidad SM-5. El bote se ancló con la finalidad de mantenerlo fijo mientras se realizaba la toma de muestras y de datos físico-químicos.

El muestreo en cada punto se lo hizo con una red cónica de plancton de 64 μm (Figura 5). Obteniendo la muestra desde el fondo hacia la superficie de la columna de agua del lago, en un envase recolector de 100 ml. Los organismos capturados fueron depositados en un envase libre de sustancias tóxicas, por lo cual previamente los envases fueron enjuagados con agua desionizada y homogenizados con agua del ambiente, y se trasladaron con agua propia del lago. Una vez en el laboratorio los organismos fueron separados en diferentes recipientes para su identificación y diferenciación bajo microscopio compuesto.



Figura 5. Colecta de muestras de zooplancton con red de 64 μm

2.3.2 Aclimatación de los organismos de prueba

Posterior al proceso de aislamiento e identificación de los organismos en el laboratorio se depositaron en envases con agua del ambiente natural, para comenzar el proceso de aclimatación en base a Bernal & Rojas, (2007). Pasadas 24 horas desde el inicio de la aclimatación se trasladaron los individuos a envases con 50% de agua del lago y 50% de agua reconstituida misma que se estabilizó con las condiciones fisicoquímicas del lago tanto temperatura, pH, oxígeno disuelto y dureza, a fin de que se adapten al agua reconstituida preparada, 48 horas después se trasladaron a envases con el 100% de agua reconstituida completando así el proceso de aclimatación e iniciándose la frecuencia de alimentación.

2.3.3 Mantenimiento de los organismos de prueba

Se mantuvo un patrón estándar de las condiciones ambientales a fin de conseguir datos confiables. Por lo cual el cultivo de cladóceros de la familia *Daphniidae* se instaló en un área libre de sustancias tóxicas, para evitar la alteración de la sensibilidad de los cultivos (NMX-AA-087-SCFI, 2010). El cultivo se mantuvo a una temperatura de 22 ± 2 °C, con un fotoperiodo aproximado de 16:8 (luz:oscuridad); y una intensidad lumínica de 750-850 lux (Figura 6).

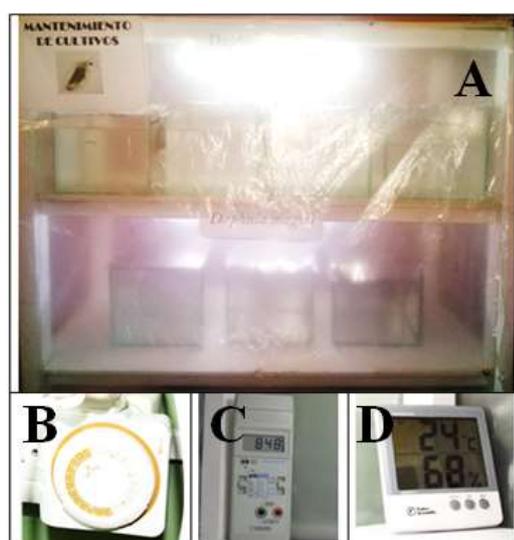


Figura 6. (A) Cámara bioclimática, (B) Timer, (C) Luxómetro, (D) Termómetro

El cultivo inició con neonatos en estado óptimo de menos de 24h de nacidos, manteniéndolos en peceras de dos litros con 20 individuos en cada una, con el objetivo de mantener las condiciones adecuadas para el desarrollo de los organismos. El cultivo fue renovado de acuerdo al ciclo de reproducción de los individuos, manteniéndolos en recipientes separados de acuerdo a la edad desde 0-4 semanas, eliminando los individuos mayores a cinco semanas y renovando el cultivo con neonatos nacidos el mismo día de eliminación (Gamez & Ramirez, 2008). Diariamente, se aislaron los neonatos con una pipeta Pasteur de plástico, con una abertura lo suficientemente ancha para no ocasionar daños a los neonatos. Se retiraron las exubias (mudas) y los restos que se encontraban en el fondo de los recipientes. Cada viernes se cambió el agua de los acuarios, los cuales se lavaron con una esponja, enjuagando varias veces con agua desionizada; sin emplear jabón ni otros detergentes. La Tabla 4 muestra las condiciones de mantenimiento de los individuos.

Tabla 4

Condiciones para el mantenimiento de cultivos

Temperatura	21±2 °C
Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
Intensidad luminosa	750-850 lux (luz blanca fría) en la superficie del líquido
Fotoperiodo	16 horas luz/ 8 oscuridad
Volumen recipientes de mantenimiento	2 litros
Alimentación	Solución líquida de alfalfa y levadura
Densidad poblacional	≤ 20 individuos/L
Limpieza	Diariamente
Recolección de neonatos	Diariamente

2.3.4 Preparación de agua reconstituida

El agua reconstituida se realizó en base a la Metodología ABNT NBR 12713, (2016) y CETESB L5.018, (1994), a fin de representar las condiciones de sales

disueltas encontradas en el hábitat natural de los organismos, cuidando que los reactivos tengan el 99% de pureza.

Tabla 5

Stock preparación agua reconstituida

Reactivos	Stock (g/L)	ml de stock sobre L
Cloruro de calcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	13.5	15.0 ml/L
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	20.5	6.0 ml/L
Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃)	10.0	20.0 ml/L
Cloruro de potasio (KCl)	10.0	7.5 ml/L

Fuente: Díaz et al., (2004)

El agua reconstituida se elaboró con cloruro de calcio 15.0 ml/L, sulfato de magnesio 6.0 ml/L, bicarbonato de sodio 20.0 ml/L, cloruro de potasio 7.5 ml/L y posteriormente se aforó con agua destilada (Tabla 5). Una vez elaborada el agua reconstituida, se oxigenó por un periodo de 48 horas permanentemente con la ayuda de una bomba de circulación (marca SEA STM, modelo HX-200L), a fin de conseguir una concentración de oxígeno disuelto mayor a 6 mg/L óptima para el desarrollo de los organismos.

Tabla 6

Control de parámetros

Parámetro	Método	Rango
Temperatura	Termómetro	21 °C ± 2 °C
Oxígeno disuelto	Multiparámetro YSI	> 6 mg/L
pH	pH-metro	7.0 – 8.0 unid.
Dureza	Titulométrico EDTA	160-180 mg/l

Mediante el uso de un multiparámetro (YSI 556) se midieron los parámetros fisicoquímicos del agua reconstituida como temperatura, oxígeno disuelto, pH en los rangos descritos en la Tabla 6. La dureza se realizó en el laboratorio privado ACU-CHEM de la ciudad de Ibarra.

2.3.5 Preparación de alimento para *Daphnia pulex*

Como fuente de alimento se suministró 0.10 ml de un concentrado de jugo de alfalfa más jugo de levadura en partes iguales. Para la preparación de jugo de alfalfa se agregó 0.1 g de alfalfa por ml de agua reconstituida. De igual manera para la preparación de levadura disuelta se agregó 0.1 g de levadura fresca por ml de agua reconstituida.

La alimentación se realizó cada tres días, con un reemplazo de agua reconstituida en un 70% cada 8 días. La metodología empleada para la preparación del alimento se basó en lo descrito por Garcés, (2013) y EPA-821-R-02-012, (2002).

2.4 Caracterización morfológica de cladóceros de la familia *Daphniidae*

En primer lugar se realizó la colecta de individuos siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.3.1. Consecutivamente, se inició con la identificación taxonómica de los cladóceros de la familia *Daphniidae* aislándolos de las muestras tomadas en el lago con la ayuda de un estéreo microscopio, debido al pequeño tamaño de los cladóceros lo que impide la toma directa de ejemplares.

Una vez aislados se procedió a la identificación taxonómica de los ejemplares en microscopio óptico, colocando ejemplares vivos en un portaobjetos con una gota de glicerina a fin de entorpecer sus movimientos y poder identificar sus partes (Durrell, 1992).

Se examinó diferentes partes de cada individuo tales como vesícula óptica, rostro, antena, garra post-abdominal, procesos abdominales, espina caudal, se utilizó variables dicotómicas y variables empíricas observables. Se tomó diez individuos al azar de la población muestreadas en el lago Yahuarcocha. Los cladóceros de la familia *Daphniidae* se identificaron mediante la ayuda de claves dicotómicas disponibles en trabajos de EPA-821-R-02-012, (2002); Haney et al., (2013); Witty, (2004).

Para la evaluación de las características dicotómicas cuantitativas (tamaño (mm), número de dientes y número de espinas anales), se realizó una prueba de Kruskal Wallis para una muestra independiente con una significancia del 5% ($\alpha=0.05$). Se utilizó estadística no paramétrica debido a que las dos variables no cumplían con el supuesto de normalidad. Esto permitió establecer diferencias entre los datos obtenidos en esta investigación y aquellos registrados en las fichas taxonómicas. La variable número de espinas anales se analizó con una prueba de T-student para una muestra independiente. La cual tuvo como finalidad comparar las medias de espinas anales entre *Daphnia pulex* de Yahuarcocha y las características de *Daphnia pulex* establecidas en trabajos como EPA-821-R-02-012, (2002); Haney et al., (2013) y Witty, (2004).

2.5 Caracterización molecular de *Daphnia* spp.

Con el fin de corroborar las técnicas morfológicas mediante el empleo de cebadores específicos de *Daphnia pulex*, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como técnica genética para la identificación de la especie de *Daphnia* del lago Yahuarcocha. Para lo cual se realizó una estandarización de los métodos de aislamiento de ADN de muestras de tejido, de agua de acuario y estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa. Los organismos usados en estos análisis fueron cultivados de acuerdo a la metodología descrita anteriormente en el numeral “3.3 Cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba”.

2.5.1 Estandarización del protocolo de aislamiento de ADN a partir de muestras de tejido de *Daphnia* spp.

Se recolectó de 1 a 5 mg de tejido de ejemplares de *Daphnia* spp. de la tercera generación en adelante para el aislamiento de ADN; para ello se utilizó el kit de purificación de ADN MasterPure™ (Epicentre, Madison, WI, EE.UU.), en base al protocolo establecido para muestras de tejido (Tissue Samples). El protocolo fue

modificado en base a recomendaciones realizadas por Athanasio, Chipman, Viant, y Mirbahai (2016).

Para el aislamiento de ADN se extrajo de 1 a 5 mg de tejido de ejemplares de *Daphnia* spp., inmediatamente se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se homogenizó con pistilo en refrigerantes. Seguidamente se añadió 1 μ l de *Proteinasa K* y 300 μ L de *Tissue and Cell Lysis Solution* y se mezcló en vórtex por 30s. Posteriormente se incubó a 65°C en baño maría durante 15 min, mezclando en el vórtex brevemente cada 5 min y se dejaron las muestras en incubación durante toda la noche a 65°C, para la digestión del exoesqueleto quitinoso de *Daphnia*. Luego de la incubación, las muestras se enfriaron en baño maría a 37°C por 3 min y se añadió 3 μ l de ARNasa a una concentración de 50 μ g/ μ l; mezclando posteriormente en el vórtex.

A continuación los tubos fueron incubados a 37°C por 30 min, consecutivamente fueron colocados en hielo durante 5 min y se añadió 175 μ l de MPC (Protein Precipitation Reagent), mezclando en vórtex por 10s. Posteriormente, los tubos eppendorf fueron centrifugados a 4°C por 10 min a 10000 rpmm, obteniendo un pellet y un sobrenadante. El sobrenadante se trasladó a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml, y el pellet se lo desechó.

Al sobrenadante se le agregó 500 μ l de isopropanol frío y se invirtió el tubo 40 veces manualmente. Inmediatamente se lo centrifugó a 4°C durante 10 min a 10000 rpm. Mediante la centrifugación se obtuvo un pellet y un sobrenadante, cuidadosamente se retiró el sobrenadante sin despegar el pellet y se lo desechó. Al pellet se lo lavó dos veces con etanol frío al 70%. Luego de remover los restos de etanol se secó los tubos a temperatura ambiente hasta que el etanol se evapore completamente. Finalmente se resuspendió el pellet en 20 μ l de agua estéril ultrapura.

2.5.2 Cuantificación de ADN genómico por electroforesis

Para la electroforesis en gel de agarosa, se preparó 50 ml del tampón Tris, borato y EDTA (TBE 1x), con 5 µl de Sybr safe (1 µl de Sybr Safe por 10 ml de TBE) a un porcentaje de 1.2% de agarosa ultra pura. Como fuente de calor se utilizó el microondas puesto que permite fundir la agarosa en TBE de forma rápida, posteriormente se enfrió el gel y se lo vertió en la cubeta, colocando el peine que formó los pocillos. Luego de solidificado el gel, se retiró el peine y se colocó el gel dentro de la cámara de electroforesis. A continuación, se añadió TBE 0.5 X hasta cubrir el gel.

Posteriormente se cargó las muestras de ADN en el gel de agarosa, para lo cual se mezcló 4 µl de ADN suspendido en agua estéril ultrapura con 1 µl de loading dye y como marcador molecular para la cuantificación se empleó un ladder de 1kb. Para correr el gel se utilizó una cámara de electroforesis (Mupid One) a 100 V, por 30 min. Los resultados se visualizaron en un transiluminador.

2.5.3 Estandarización del protocolo de aislamiento de ADN de *Daphnia* spp. de agua de acuario.

La investigación se desarrollo siguiendo el kit modificado MasterPure™[®] K para lo cual se filtró dos muestras de 250 ml de agua de cada pecera a través de membranas de nitrocelulosa de 45 micras de diámetro. Cada membrana fue cortada a la mitad y dividida en partes, que fueron colocadas en cuatro tubos eppendorf de 1.5 ml que se utilizaron para el proceso de extracción de ADN (4 mitades de membranas = 1 muestra) .

Al tubo con pedazos de membrana se añadió 1 µl de proteinasa K a una concentración de 50 µg/µl diluido en 300 µL Tissue and Cell Lysis Solution, seguido de vórtex por 5 min. Todos los tubos con las muestras se incubaron a 65°C por 15 min, mezclando en el vórtex cada 5 min. Posteriormente se dejaron las

muestras en incubación durante la noche a 65°C. Al día siguiente con una pipeta se retiró todo el líquido de cada tubo, y se transfirió a otro eppendorf estéril de 1.5 ml. El tubo eppendorf con la membrana fue desechado.

Se añadió 1.3 µl de RNasa con una concentración de 5 µg/µl a cada muestra y se mezcló en vórtex por 5 min. Los tubos fueron incubados a 37 °C por 30 min en baño maría. Después del baño maría los tubos eppendorf con las muestras fueron colocadas en hielo durante 15 min. Inmediatamente después de los 15 min en hielo, se añadió 233 µl de MPC (Protein Precipitation Reagent) a cada muestra y se mezcló en vórtex por 1 min. Luego se centrifugó los tubos con las muestras a 13000 rpm por 10 min y 4°C.

Se obtuvo un pellet y un sobrenadante, el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml, y el pellet desechó. Al sobrenadante se agregó 500 µl de isopropanol frío y se invirtió el tubo 40 veces manualmente. Luego se lo centrifugó a 10000 rpm durante 10 min y 4°C.

A continuación, se obtuvo un pellet y un sobrenadante, cuidadosamente se pipeteó el sobrenadante y se lo desechó (todo esto sin que el pellet se desprege). Al pellet se lo lavó dos veces con etanol frío al 70%, luego de remover los restos de etanol se secó los tubos durante 3 horas a temperatura ambiente. Finalmente cada pellet en se resuspendió en 20 µl de agua estéril ultrapura y se mezcló el contenido de los tubos Eppendorf perteneciente a las mismas muestras filtradas.

2.5.4 Parámetros físico-químicos y validación *in silico* de cebadores específicos de *Daphnia pulex*

Los cebadores utilizados fueron tomados de la investigación “A microsatellite-based genetic linkage map of the waterflea, *Daphnia pulex*: On the prospect of crustacean genomics”(Cristescu, Colbourne, Radivojac, y Lynch, 2006). Los cuales amplifican un fragmento conservado del gen COX1 (citocromo c oxidasa

subunidad I codificante de proteínas (ID gen 808488). En la Tabla 7 podemos observar las características del primer forward (*Dpulex* 1498 Fw) y reverse (*Dpulex* 1498 Rv), los cuales poseen 451 pb.

Con la finalidad de garantizar la especificidad de los primers para *Daphnia Pulex* se realizó una validación in silico, para lo cual se utilizó los programas OligoAnalyzer 3.1 IDT y NCBI-BLAST (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>); donde se tomó en cuenta el porcentaje de identidad (identity) y la cobertura de la secuencia diana (coverage) como parámetros para determinar la especificidad de los cebadores.

Tabla 7
Características físico-químicas de los cebadores

Nombre del cebador	Dpulex 1498 Fw	Pares de bases	451 pb
Secuencia 5´ a 3´	CAC GAT ACG GCG GAT TTT GT	Tamaño del primer	20
Peso molecular (µg/µmol)	6,149.0	Escala de síntesis	50N
Pureza		µg por OD	28.28
% Contenido GC	50	nmoles por OD	4.60
Tm (1M Na+)	85	OD´s	9.94
Tm (50 mM Na+)	63	µg´s	281.15
		Nmoles	45.7
Nombre del cebador	Dpulex 1498 Rv		
Secuencia 5´ a 3´	TCA AAA CGG CAA CAT GGA GA	Tamaño del primer	20
Peso molecular (µg/µmol)	6,169.0	Escala de síntesis	50 N
Pureza		µg por OD	25.19
% Contenido GC	45	nmoles por OD	4.08
Tm (1M Na+)	84	OD´s	12.78
Tm (50 mM Na+)	63	µg´s	321.88
		Nmoles	52.1

Fuente: Adquisición de casa comercial Gustavo Venegas

2.5.5 Estandarización de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con cebadores específicos de *Daphnia pulex*

A fin de determinar resultados eficientes se probaron dos diferentes masters mix GoTaq® Green Master mix de Promega y Taqman® Environmental Master Mix 2.0. de Applied Biosystems, ambas master mix se utilizaron en volúmenes de 25 µl y 10 µl; para el volumen de 25 µl se utilizó 12.5 µl de Master mix, 10.5 µl de agua destilada ultra pura, 0.5 µl (10 µM) de cada cebador y 1 µl de ADN. En el volumen de 10 µl se utilizó: 5 µL de Master Mix, 3.6 µL de agua destilada ultra pura, 0.4 µL (10 µM) de cada cebador y 0.6 µL de ADN.

A fin de determinar la temperatura óptima de alineamiento (annealing) se analizó un rango de temperaturas entre 52-59 °C, de esta forma las temperaturas establecidas para la PCR fueron: un ciclo de 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min y 72 °C por 1:30 min y un ciclo final de 72 °C por 5 min.

2.6 Determinación de la concentración letal media CL₅₀₋₄₈ de plomo, y dicromato de potasio como tóxico de referencia.

A fin de determinar la concentración letal media (CL₅₀₋₄₈) en un periodo de 48 horas del tóxico de referencia, plomo y agua del lago Yaharcocha utilizando *Daphnia pulex* como bioindicador, se realizó bioensayos de toxicidad aguda. En base a protocolos internacionales CETESB (Compañía de Tecnología y Saneamiento ambiental de Sao Paulo, Brasil) y USEPA (United States Environmental Agency).

En los ensayos de toxicidad se utilizó neonatos de 6-24 horas de nacidos debido a que estos no requieren de alimento por 4 días, ya que desde su nacimiento poseen los nutrientes necesarios para alimentarse hasta adaptarse al medio que habitan, además de ser más sensibles a los tóxicos. Se utilizó cepas de *Daphnia pulex* provenientes del lago Yahuarcocha sometiénolas al tóxico por un periodo de 48 horas para determinar la concentración a la cual el 50% de la población muere.

2.6.1 Preparación de soluciones para análisis de toxicidad

Las soluciones se prepararon con agua reconstituida, excepto las soluciones madre que fueron preparadas con agua. Las soluciones se mantuvieron refrigeradas por un tiempo no mayor a seis meses. Previo a realizar los ensayos de toxicidad las soluciones eran aclimatadas por un periodo de 3 horas a fin de evitar la mortandad de los organismos debido al cambio de temperatura.

2.6.1.1 Preparación de soluciones de Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Para la preparación de las diferentes concentraciones del tóxico de referencia, previamente se realizó una solución madre a una concentración de 100 ppm. Para lo cual se pesó 0.1 gramos (100 ppm) de dicromato de potasio en 500 ml de agua destilada. Posteriormente a partir de la solución madre de 100 ppm se preparó una solución de partida a una concentración de 5 ppm, de la solución de 5 ppm se realizaron las diferentes diluciones para cada una de las concentraciones, aforando cada concentración a 500 ml de agua reconstituida. Para la preparación de las diferentes soluciones se utilizó la siguiente ecuación: $V_1C_1 = V_2C_2$, donde: V_1 corresponde al volumen a calcular, C_1 hace referencia a la concentración del stock, V_2 al volumen a preparar (500 ml) y C_2 a la concentración con la cual se va a trabajar.

2.6.1.2 Preparación de soluciones de plomo (Pb)

Para la preparación de la solución patrón de plomo se disolvió 0.1 gr de plomo puro metálico granulado en ácido nítrico concentrado y se diluyó a un litro de agua destilada. Posteriormente, se realizó una solución de partida de 5 ppm, de la cual se realizaron cada una de las diluciones a las diferentes concentraciones; cada solución se aforo a 500 ml de agua reconstituida y finalmente se reguló el pH a 3.5. Para la preparación de las diferentes diluciones se utilizó la misma fórmula anteriormente indicada.

2.6.1.3 Toma, preservación y diluciones de muestras ambientales del lago Yahuarcocha

La recolección de las muestras de agua del lago se realizó en recipientes de dos litros, se tomó muestras de la entrada de río Tahuando, del muelle y del punto profundo (Figura 7). Los análisis se llevaron a cabo durante las primeras 24 horas después de la recolección para evitar variaciones en sus características, además hasta la ejecución de ensayos las muestras se mantuvieron en refrigeración.



Figura 7. (A) Muestreo de agua en el lago (B) Muestreo en la entrada del lago (C) Traslado de muestras

2.6.2 Montaje de análisis de ecotoxicidad

Las pruebas de toxicidad se realizaron en base a los protocolos establecidos por CETESB y USEPA, a fin de determinar la concentración que afecta al 50% de la población, provocando su muerte en 48 horas (CL_{50-48}). Se llevó a cabo 20 veces el ensayo, a fin de obtener resultados estadísticamente representativos. Realizando 10 ensayos preliminares en los cuales se utilizó un amplio rango de concentraciones a fin de determinar el 0% y 100% de mortalidad de los organismos sobre el tóxico y 10 ensayos definitivos empleando las concentraciones seleccionadas en base a los resultados de los ensayos preliminares, obteniendo la CL_{50} de cada tóxico.

En el montaje para cada prueba se utilizaron 24 tubos por ensayo, distribuidos en cinco (5) concentraciones de las respectivas soluciones, de las cuales se hicieron cuatro (4) réplicas y cuatro controles (Figura 8). Una vez lista la batería de ensayos se adicionó 10 mililitros de las concentraciones en tubos de ensayo y el mismo volumen en sus respectivos controles.

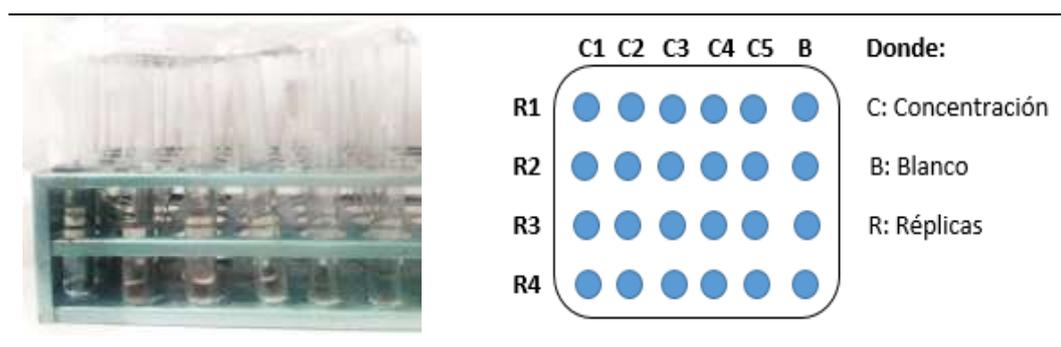


Figura 8. Montaje pruebas de toxicidad

En cada tubo se adicionó cinco (5) individuos, con un total de 120 organismos por montaje. Posteriormente se cubrió la batería de ensayos y se trasladó al área de mantenimiento de cultivos, manteniéndolos en las condiciones descritas en el apartado 2.3.3. Al término de las 48 horas se realizó el conteo de los organismos muertos en cada tubo, reportando el número de individuos muertos en las hojas de registro. Finalmente se utilizó el Método de Unidades Probabilísticas “Probit” para evaluar la relación concentración respuesta del tóxico sobre los organismos.

2.6.2.1 Pruebas de sensibilidad con el tóxico de referencia dicromato de potasio

Los ensayos de sensibilidad no solo tienen como finalidad garantizar confianza sobre la capacidad de respuesta de los organismos de prueba ante los tóxicos, sino también garantizar el estado fisiológico del cultivo. Para lo cual fue necesario realizar una calibración del método mediante el uso de dicromato de potasio como tóxico de referencia ya que es el recomendado por la norma ISO 6341-1982 y por protocolos internacionales CETESB y USEPA, igualmente utilizado ampliamente

en diferentes investigaciones tales como: Velandia y Montañez, (2010), Gamez y Ramirez, (2008), Vargas y Perea, (2011), entre otras.

Los ensayos se realizaron en dos etapas: pruebas preliminares, en los que se manejó un amplio rango de concentraciones a fin de establecer el 0% y 100% de mortalidad; las concentraciones preliminares de dicromato de potasio utilizadas con *Daphnia pulex* fueron 0.001, 0.01, 0.1, 1.5 ppm, a partir de los resultados de las pruebas preliminares se establecieron las concentraciones para las pruebas definitivas. Se hicieron 10 pruebas definitivas con dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ con concentraciones 0.1, 0.5, 0.7, 1.0, y 1.2 ppm de esta solución, esto permitió obtener la concentración letal media CL_{50-48} .

2.6.2.2 Pruebas de toxicidad para plomo (Pb)

A partir de una solución stock a 5ppm de Plomo (marca LOBAL Chemie), se prepararon las soluciones preliminares 0.001, 0.01, 0.1, y 1.5 ppm, empleando un amplio rango de concentraciones a fin de determinar el 0% y 100% de mortalidad de los organismos. De acuerdo a los resultados de las pruebas preliminares se estableció las concentraciones para las pruebas definitivas. Se realizaron 10 ensayos definitivos con concentraciones de 0.05, 0.10, 0.30, 0.50 y 0.70 ppm de plomo a fin de determinar el grado de sensibilidad.

2.6.2.3 Pruebas de toxicidad de la muestra de agua del lago Yahuarcocha

Para los ensayos con la muestra ambiental del lago Yahuarcocha, se tomó en cuenta los parámetros fisicoquímicos como pH, temperatura, oxígeno disuelto, dureza, y el metal plomo a evaluar. En éstos ensayos se emplearon diferentes porcentajes de volumen diluidos en agua reconstituida, a fin de establecer el 0% y 100% de mortalidad. De las soluciones preparadas se distribuyeron 10 ml en cada tubo de la batería de ensayos y en los controles respectivos. *Daphnia pulex* se sometió a diluciones de 100%, 80%, 60%, 40% y 20% de muestra de agua del lago, realizando

tres (3) repeticiones con muestras del punto profundo y tres (3) repeticiones con muestras del muelle.

2.7 Análisis estadístico Probit y ANOVA

2.7.1 Análisis Probit y ANOVA de Dicromato de potasio

Se evaluó la sensibilidad del cultivo de *Daphnia pulex*, mediante análisis probit se determinó la concentración letal media CL_{50-48} de dicromato de potasio a partir de los resultados de las pruebas definitivas (Anexo 7). Con un límite superior e inferior del 95% de confianza, con estos datos se construyó la carta control de dicromato de potasio, obteniendo el promedio de 10 pruebas definitivas.

La mortalidad de *Daphnia pulex* presenta un comportamiento normal en los diferentes grupos de repeticiones. Se decidió realizar un diseño en bloques completamente al azar bloqueando el grupo de 10 repeticiones. Dado que se cumple el supuesto de equivalencia de grupos y que la regresión lineal indica que las observaciones son independientes, se ejecutó el ANOVA y Tukey.

2.7.2 Análisis Probit y ANOVA de plomo

Se estimó la concentración letal media CL_{50-48} de plomo, ajustando los datos de mortalidad del cultivo de *Daphnia pulex* mediante análisis probit para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancias. Expresando el porcentaje de organismos muertos por el plomo en unidades Probit, donde la concentración perteneciente a Probit 0.5 corresponde a la cantidad de plomo capaz de matar a la mitad de la población. Con un límite superior e inferior del 95% de confianza, con estos datos se construyó la carta control de plomo, obteniendo la CL_{50} de 10 pruebas definitivas (Anexo 8).

La mortalidad de *Daphnia pulex* no presenta distribución normal para los diferentes niveles de las concentraciones de plomo; sin embargo, presenta un comportamiento

normal en los diferentes grupos de repeticiones. Por lo que se decidió realizar un diseño en bloques completamente al azar bloqueando el grupo de 10 repeticiones. Dado que se cumple el supuesto de equivalencia de grupos y que la regresión lineal indica que las observaciones son independientes, se ejecutó el ANOVA y la prueba Tukey

2.7.3 Análisis Probit y ANOVA de muestra ambiental

Se estimó la concentración letal media CL_{50-48} de la muestra ambiental del lago Yahuarcocha del punto profundo y del muelle, ajustando los datos de mortalidad del cultivo de *Daphnia pulex* mediante análisis probit para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancias de una muestra de 3 repeticiones por punto. Expresando el porcentaje de organismos muertos por las diluciones de la muestra ambiental (20%, 40%, 60%, 80% y 100%) en unidades Probit, donde la concentración perteneciente a Probit 0.5 corresponde a la cantidad de muestra capaz de matar a la mitad de la población. Con un límite superior e inferior del 95% de confianza, con estos datos se construyó la carta control (Anexo 9).

La mortalidad de *Daphnia pulex* no presenta distribución normal para los diferentes diluciones de muestras de agua del punto profundo y del muelle del lago; sin embargo presenta un comportamiento normal en los diferentes grupos de repeticiones. Por lo tanto se realizó un diseño en bloques completamente al azar bloqueando el grupo de 3 repeticiones. Dado que se cumple el supuesto de equivalencia de grupos y que la regresión lineal indica que las observaciones son independientes, se ejecutó el ANOVA y la prueba de Tukey.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante el periodo de investigación. Iniciando con el seguimiento del cultivo, identificación de la especie de *Daphnia* spp. mediante caracterización morfológica y molecular. Posteriormente, análisis de parámetros fisicoquímicos y concentración de plomo en el cuerpo de agua del lago. Finalmente, determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₄₈) de dicromato de potasio, plomo y muestra ambiental.

3.1 Cultivo de *Daphnia pulex*

La edad adulta de los neonatos fue alcanzada después de 8 días del nacimiento; esto se comprobó debido a que los crustáceos empezaron su proceso de oviposición y a partir del décimo día nacieron las crías. La regeneración de *Daphnia pulex* fue similar a la investigación realizada por Bernal & Rojas, 2007; así como López, 2009; Velandia & Montañez, 2010. Ya que se observó que durante las dos primeras semanas existió un incremento en el número de nacimientos. Mientras que en la tercera y cuarta semana, se presentó una disminución cumpliendo con el ciclo de vida establecido en éstas investigaciones.

La Tabla 8 muestra el registro de neonatos realizado en 4 peceras, durante la primera semana del cultivo de *Daphnia pulex* mostró un incremento paulatino en el nacimiento de organismos, registrando un mínimo de 280 organismos y alcanzando un pico de 642 crías a inicios de la tercera semana. A partir de la tercera semana se presentó una disminución en el número de nacimientos variando desde el pico de

642 organismos hasta llegar a 327 organismos a finales de la cuarta semana; lo cual permitía hasta 5 pruebas de toxicidad (Figura 9).

Es importante mencionar que los datos expuestos en la Tabla 8, hacen referencia los resultados óptimos para la reproducción de *Daphnia pulex*. Si se hace una comparación con los cultivos iniciales, la reproducción fue menor al 50% aproximadamente.

Tabla 8

Registro de neonatos

N° de Semanas	Pecera				N° de neonatos
	1	2	3	4	
1	89	58	63	70	280
	73	83	75	78	309
2	89	93	98	95	375
	115	108	112	101	436
	130	131	127	138	526
	147	144	138	140	569
3	156	167	159	160	642
	143	155	146	157	601
	122	136	133	140	531
4	116	120	98	113	447
	96	110	81	84	371
	88	95	73	71	327
Mediana	116	115	105	107	5414

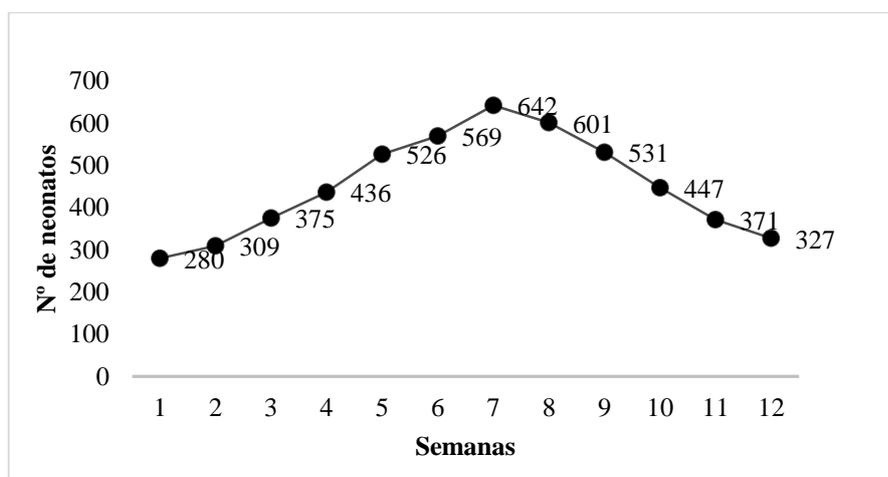


Figura 9. Reproducción de *Daphnia pulex*

3.2 Caracterización morfológica de *Daphnia* spp. del lago Yahuarcocha

Se examinó morfológicamente estructuras tales como: vesícula óptica, rostro, antena, garra post-abdominal, procesos abdominales, y espina caudal de una muestra que constó de 20 individuos de diferentes épocas (Anexo 3). Se determinó que el 100% de ejemplares mostraban una vesícula óptica cercana al margen de la cabeza, polígonos isodiamétricos a nivel del rostro, una segunda seta natatoria larga, pecten medio con dientes más desarrollados, segundo proceso abdominal largo densamente pubescente y espina caudal corta (Tabla 9).

Tabla 9
Características dicotómicas descriptivas

Características	Modalidades	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)
Vesícula óptica	Toca el margen de la cabeza	20	100
	No toca el margen de la cabeza	0	0
Rostro	Polígonos isodiamétricos	20	100
	Polígonos alargados	0	0
Antena	Segunda seta natatoria corta	0	0
	Segunda seta natatoria larga	20	100
	Pecten medio, distal y proximal uniformes	0	0
Garra post-abdominal	Pecten medio con dientes más desarrollados	20	100
	Dientes del pecten medio de tamaño intermedio	0	0
Procesos abdominales	Segundo proceso abdominal corto, densamente pubescentes (<i>D. pulicaria</i>)	0	0
	Segundo proceso abdominal largo, densamente pubescentes (<i>D. pulex</i>)	20	100
Espina caudal	Corta	20	100
	Larga	0	0

El análisis estadístico de características dicotómicas cuantitativas mediante Kruskal Wallis al 5%, no mostró diferencias significativas en la variable tamaño ($X^2=0.285$; $gl=9$; $p> 0.05$) respecto a la morfología de *Daphnia pulex* establecida por bibliografía. Además, el número de dientes ($X^2=0.281$; $gl=9$; $p>0.05$) y espinas anales ($t=1.10$; $gl=9$; $p=0.299$) tampoco mostraron diferencias significativas respecto a la morfología de *Daphnia pulex*. De los 20 individuos analizados en los diferentes periodos, el 100% se encuentran dentro del rango de características dicotómicas establecidas para *Daphnia pulex* (Tabla 10).

Tabla 10
Características dicotómicas numéricas

Características	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	<i>Daphnia pulex</i>
Tamaño (mm)	2.70	0.38	2.50	3.50	1.1-3.5 mm
N° Dientes del pecten medio	6.00	0.47	5.00	6.00	5-7 dientes pecten medio
N° Espinas anales	13.00	1.46	11.00	16.00	10-16 espinas anales

3.3 Identificación molecular de *Daphnia.spp* del lago Yahuarcocha

A fin de corroborar los datos obtenidos en el análisis morfológico se realizó PCR con primers específicos de la especie *Daphnia pulex*.

3.3.1 Diseño y validación *in silico* de primers

Para garantizar que los cebadores seleccionados amplifican la región genómica de interés, se evaluó la especificidad para la detección y la amplificación del fragmento conservado del gen COX1 (citocromo c oxidasa subunidad I) codificante de proteínas. El par de cebadores *D. pulex* 1498 produjeron un porcentaje de identidad (identity) y de cobertura de la secuencia diana (coverage) del 100% como se muestra en las Figura 10 y Figura 11.



Figura 10. Representación gráfica de la alineación del primer forward en la secuencia específica de la especie *Daphnia pulex*.



Figura 11. Representación gráfica de la alineación del primer reverse en la secuencia específica de la especie

3.3.2 Estandarización del ensayo de PCR para la identificación molecular de *Daphnia pulex*

Los resultados de estandarización de la PCR de *Daphnia pulex* mostraron una alta especificidad de los “primers” Dpulex 1498 Fw/Rv que amplificaron una banda de 500 pb en el 100% de muestras (Figura 12). Se determinó como temperatura óptima de alineamiento 56°C para los primers *D.pulex*-Fw *D.pulex*-Rv, tras haber ensayado con diferentes temperaturas de alineamiento. Las temperaturas establecidas para la PCR fueron: un ciclo de 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min y 72°C por 1.30 min, y un ciclo final de 72°C por 5 min. Un volumen de 25 µl se estableció como necesario para obtener resultados de PCR eficientes, tras haber ensayado con volúmenes de 10 a 25 µl.

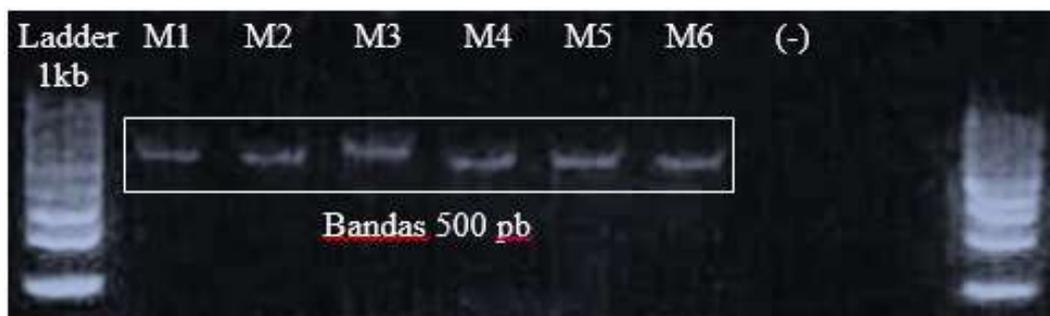


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % teñido con SYBR Safe, donde se observan los resultados de PCR y se muestra amplificaciones de bandas de 500 pb a una temperatura de 56 °C con Gotaq Green master mix, usando muestras de tejido de *D.pulex*.

3.4 Análisis de metales pesados del cuerpo de agua del lago Yahuarcocha

Por medio del equipo de absorción atómica se tomó lecturas por duplicado del metal plomo de muestras de agua provenientes de tres puntos de Yahuarcocha: Muelle, punto profundo y planta de tratamiento.

3.4.1 Concentración de Plomo

De las muestras analizadas todas rebasan los límites permitidos por la “Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes; recurso agua”. En base al acuerdo ministerial N° 028 del libro VI Anexo 1, Tabla 3: Criterios de calidad para la preservación de flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, aguas marinas y de estuario, donde indica que la concentración máxima permisible de plomo es de 0.01 mg/l (TULSMA, 2015). Según los datos obtenidos el punto 1 (Muelle) presenta el valor más alto de concentración (0.30 mg/l), seguido del punto 2 (Planta de tratamiento) con un valor de 0.18 mg/l y el punto 3 (Punto profundo) el más bajo (0.14 mg/l). No obstante, ningún valor es apto para la preservación de flora y fauna (Tabla 11).

Tabla 11

Concentración de Plomo (Pb) en los diferentes puntos de muestreo del lago Yahuarcocha

	Punto 1	Punto 2	Punto 3
Puntos de muestreo	Muelle	Planta de Tratamiento	Punto Profundo
Coordenadas:	(822250;10041602)	(823043;1004074)	(822290;10040688)
Muestra 1	0.31	0.21	0.16
Muestra 2	0.29	0.15	0.12
Promedio	0.30	0.18	0.14

Se debe notar que solamente se levantaron dos muestras en tres puntos lo cual no representa en forma alguna las características fisicoquímicas de la laguna, sin embargo, estas medidas se pueden tomar de referencia para los puntos específicos para las coordenadas señaladas en la tabla anterior.

3.4.2 Parámetros físico-químicos

En la Tabla 12 se presenta la ficha de campo de los parámetros físico-químicos del lago Yahuarcocha tomados durante el muestreo de agua en los diferentes puntos muelle, planta de tratamiento y punto profundo. La tabla muestra la profundidad de toda la columna de agua del lago en cada punto de muestreo y en paréntesis la profundidad a la que se tomaron los parámetros, así como también la T°, presión barométrica, oxígeno disuelto, conductividad y pH en los diferentes puntos misma que en el muelle y planta de tratamiento fue tomada en un solo punto y en el punto profundo se tomó a 7 profundidades debido a presenta una profundidad de 6.6 m.

Tabla 12

Parámetros físico-químicos

REFERENCIA	Coordenadas	Profundidad (m)	D. Secchi (cm)	T°C	Presión barométrica (mmHg)	OD %	OD mg/l	Conductividad Us/-cm	pH
MUELLE	822250; 10041602	3.6 (2.9)	0.48	20.5	590	65.5	4.53	627	08.3
P.TRATAMIENTO	823043; 100407	1.8 (1.3)	0.47	22.1	589	60.3	4.08	651	08.0
P.PROFUNDO	822290; 10040688	6.6 (2.5)	0.50	22.0	589	84.4	5.54	647	10.0

	20.2	589	55.0	3.84	623	10.0
	20.1	389	49.8	3.08	624	10.0
	20.1	589	42.1	2.45	624	10.0
	20.1	589	41.8	2.94	623	10.0
	20.1	589	41.6	2.79	623	10.0
	20.0	589	38.8	2.71	624	09.9

3.5 Determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₄₈) del dicromato de potasio, plomo y muestra ambiental, mediante bioensayos de ecotoxicidad acuática utilizando *Daphnia Pulex*

A continuación, se muestran los resultados de los ensayos de ecotoxicidad realizados en organismos de *Daphnia pulex*.

3.5.1 Pruebas de toxicidad para *Daphnia pulex*

3.5.1.1 Concentración letal media (CL₅₀) de dicromato de potasio

El promedio de la CL₅₀ para dicromato de potasio fue de 0.45 ppm, con un límite inferior de 0.32 ppm y un límite superior de 0.56 ppm, lo cual indica que los organismos mostraron sensibilidad a las pruebas, con un comportamiento constante durante la realización de las mismas (Tabla 13).

Tabla 13

Carta de control de prueba de sensibilidad

Nº Ensayo	CL50 (ppm)	Límite inferior (ppm)	Límite superior (ppm)
1	0.47	0.33	0.58
2	0.40	0.24	0.51
3	0.39	0.20	0.53
4	0.53	0.45	0.58
5	0.52	0.42	0.61
6	0.47	0.33	0.58
7	0.48	0.36	0.59
8	0.46	0.35	0.56
9	0.35	0.21	0.46
10	0.47	0.36	0.57
Promedio	0.45	0.32	0.56

El ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones de dicromato de potasio en los 10 grupos de repeticiones en la variable mortalidad de *Daphnia pulex* ($F= 285.33$; $gl= 4, 195$; $p<0.001$).

La prueba de rangos de significancia de Tukey (5%) mostró que existen cinco rangos de significancia. Encabezando el primer rango de significancia se ubicó la concentración de 1.20 ppm de dicromato de potasio con una tasa de mortalidad de 5 individuos, lo cual indica que con una concentración ≥ 1.20 ppm de dicromato de potasio mueren todos los organismos. Por otra parte, en el último rango se ubicó la dosis 0.1 ppm de dicromato de potasio con una mortalidad total de 0.8 individuos, lo cual indica una baja mortalidad (Figura 13).

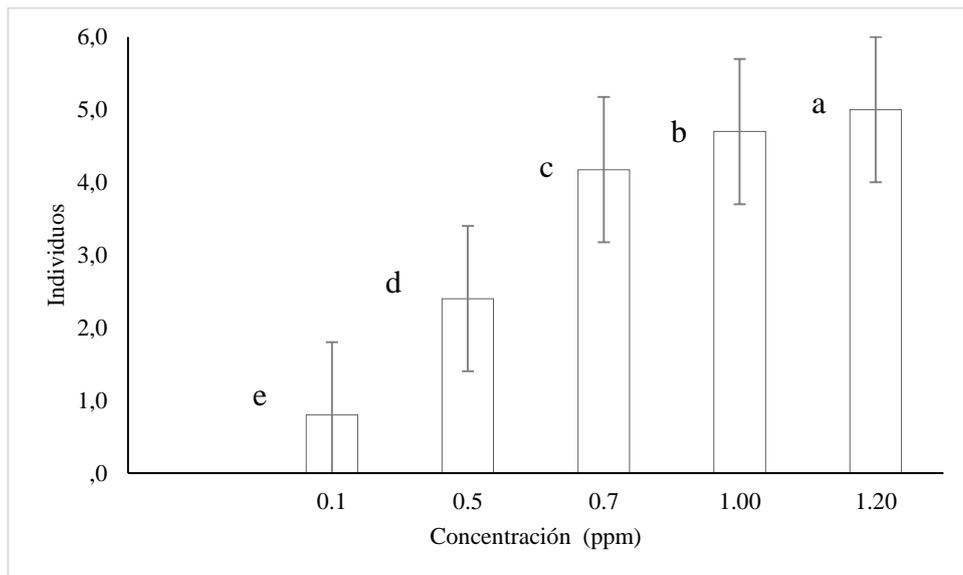


Figura 13 Mortalidad de *Daphnia pulex* con dicromato de potasio. Líneas verticales corresponden a desviación estándar. Letras simbolizan rangos de significancia (Tukey $\alpha: 0.05$)

3.5.1.2 Concentración letal media (CL_{50}) de plomo

La Tabla 14 nos muestra el promedio de resultados definitivos obtenidos de 10 pruebas de toxicidad, donde se puede observar que los valores de la CL_{50-48} en cada uno de los 10 ensayos se encuentran dentro de los límites calculados, y oscilan entre

el mismo rango. Obteniendo una CL₅₀ para plomo de 0.25 ppm, el cual se encontró entre el límite de aceptación que comprende el límite inferior 0.19 ppm y el superior 0.32 ppm, indicando confiabilidad en los resultados. De las cuales el 70% se encontraba cerca al promedio y el 30% restante se localizaba cerca al límite superior con 0.29 ppm y al límite inferior con 0.21 ppm.

Tabla 14

Carta control de plomo

N° Ensayo	CL50 (ppm)	Límite inferior (ppm)	Límite superior (ppm)
1	0.29	0.24	0.36
2	0.27	0.21	0.30
3	0.24	0.16	0.32
4	0.26	0.18	0.33
5	0.29	0.24	0.35
6	0.28	0.22	0.34
7	0.26	0.21	0.32
8	0.23	0.17	0.29
9	0.21	0.15	0.27
10	0.22	0.15	0.29
Promedio	0.25	0.19	0.32

El ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones de plomo en los 10 grupos de repeticiones en la variable mortalidad de *Daphnia pulex* (F= 423.52; gl= 4, 186; p<0.001).

La prueba de rangos de significancia de Tukey (5%) mostró que existen cinco rangos de significancia. Encabezando el primer rango se ubicó la concentración de 0.7 ppm de plomo con la tasa de mortalidad de 5 individuos, lo cual indica que con una concentración ≥ 0.70 ppm de plomo mueren todos los organismos. Por otra parte, en el último rango se ubicó la dosis 0.05 ppm de plomo con una mortalidad total de 0.4 individuos, indicando una mortalidad baja o nula (Figura 14).

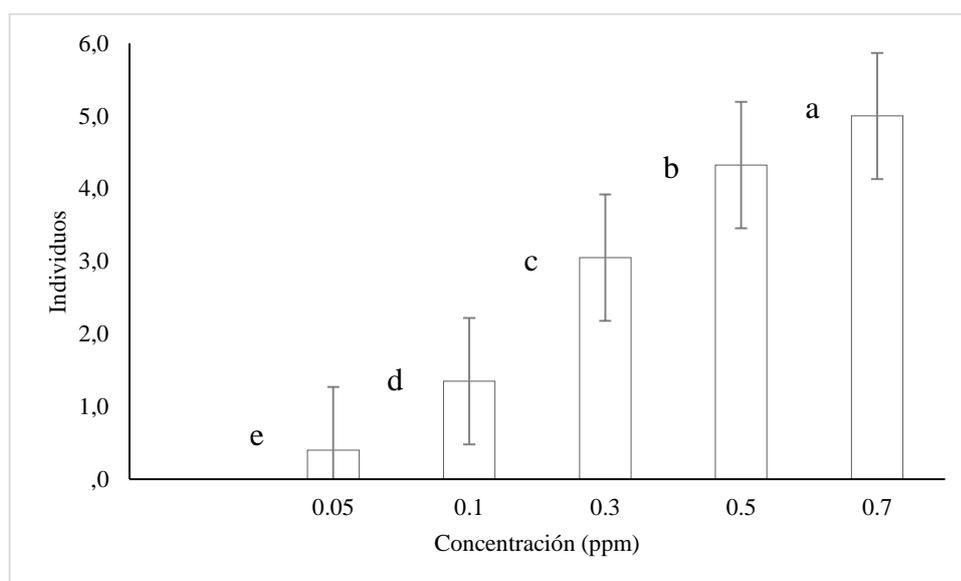


Figura 14 Mortalidad de *Daphnia pulex* con plomo. Líneas verticales corresponden a desviación estándar. Letras simbolizan rangos de significancia (Tukey α : 0.05)

3.5.1.3 Concentración letal media de muestra ambiental

Se realizaron 3 pruebas de toxicidad con muestras del punto profundo y se examinaron mediante análisis probit, obteniendo una CL_{50} de 55.19% V/V, mismo que se encuentra entre el límite de aceptación inferior 46.95% V/V y el límite superior 62.89% V/V (Tabla 15). Lo cual nos da una mayor confiabilidad en las pruebas.

Tabla 15
Carta control de muestra ambiental (punto profundo)

Nº Ensayo	CL50 % V/V	Límite inferior % V/V	Límite superior % V/V
1	51.19	41.48	59.84
2	56.15	47.99	63.91
3	58.23	51.39	64.92
Promedio	55.19	46.95	62.89

De igual manera se realizaron 3 pruebas de toxicidad con muestras del muelle y se examinaron mediante análisis probit, obteniendo una CL_{50} de 37.83% V/V, mismo

que se encuentra entre el límite de aceptación inferior 24.77% V/V y el límite superior 46.88% V/V (Tabla 16).

Tabla 16

Carta control de muestra ambiental (muelle)

Nº Ensayo	CL50 % V/V	Límite inferior % V/V	Límite superior % V/V
1	33.60	17.09	43.77
2	40.60	29.18	49.20
3	39.29	28.05	47.68
Promedio	37.83	24.77	46.88

Punto profundo

El ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas para las diluciones de muestras de agua del punto profundo del lago en los 3 grupos de repeticiones en la variable mortalidad de *Daphnia pulex* ($F= 93,64$; $gl= 4, 53$; $p<0.001$). La prueba de rangos de significancia de Tukey (5%) mostró que existen cinco rangos de significancia. Encabezando el primer rango se ubicó la muestra no sometida a dilución (100%) con una tasa mortalidad de 4.83 individuos, lo cual indica que en las muestras de agua del lago Yahuarcocha del punto profundo no sometidas a ninguna dilución (100%) mueren la mayoría de los organismos. Por otra parte, en el último rango se ubicó la dilución al 20% con una mortalidad total de 0.33 individuos (Figura 15).

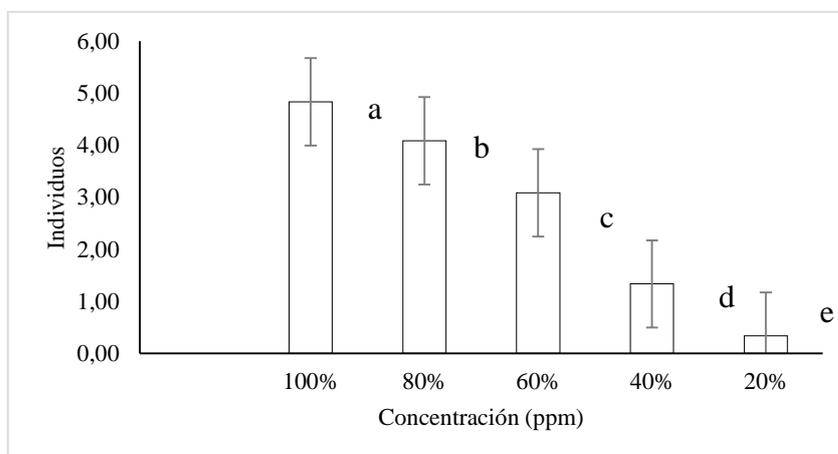


Figura 15 Mortalidad de *Daphnia pulex* con muestra ambiental de punto profundo. Líneas verticales corresponden a desviación estándar. Letras simbolizan rangos de significancia (Tukey $\alpha: 0.05$).

Muelle

El ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas para las diluciones de muestras de agua del muelle del lago en los 3 grupos de repeticiones en la variable mortalidad de *Daphnia pulex* ($F= 87,82$; $gl= 4, 53$; $p<0.001$).

La prueba de rangos de significancia de Tukey (5%) mostró que existen cinco rangos de significancia. En la Figura 16 se puede observar el número de individuos que murieron en base a las concentraciones. Encabezando el primer rango se ubicó la muestra no sometida a dilución (100%) con la tasa mortalidad de 4.92 individuos, lo cual indica que en muestras de agua de Yahuarcocha del muelle mueren casi todos los organismos. Por otra parte, en el último rango se ubicó la dilución al 20% con una mortalidad total de 1.08 individuos.

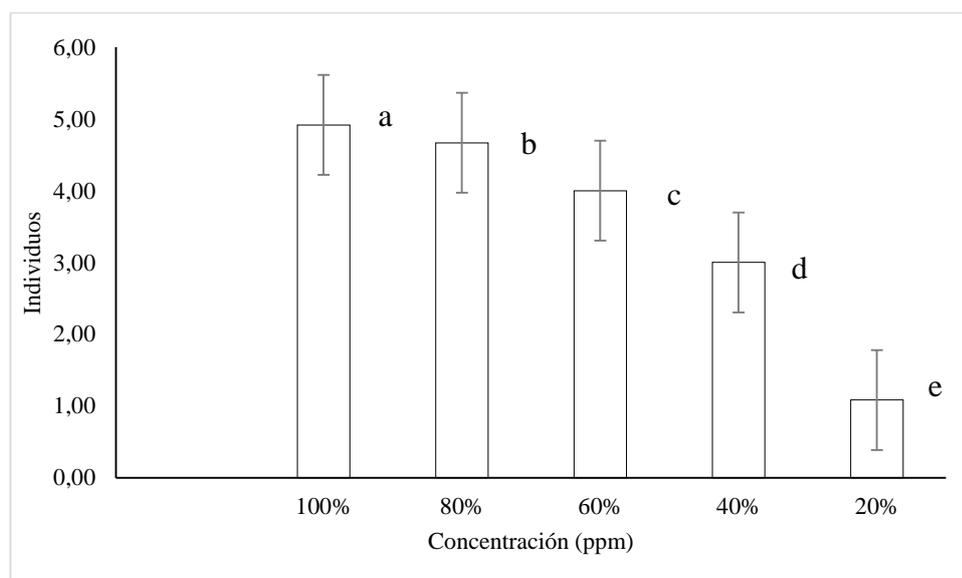


Figura 16 Mortalidad de *Daphnia pulex* con muestra ambiental del muelle. Líneas verticales corresponden a desviación estándar. Letras simbolizan rangos de significancia (Tukey $\alpha: 0.05$).

CAPÍTULO IV

4. DISCUSIÓN

A partir de los resultados encontrados en la caracterización morfológica se establece que la especie de *Daphnia* encontrada en el lago Yahuarcocha pertenece a *Daphnia pulex* debido a que el 100% de organismos se encontró dentro de las claves dicotómicas establecidas para *Daphnia pulex* en trabajos como EPA-821-R-02-012, (2002); Haney et al., (2013) y Witty, (2004). Estos resultados guardan relación con lo que sostiene Steinitz-Kannan (1979) en sus investigaciones realizadas entre 1975 y 1978, donde reportó la especie *Daphnia pulex* de la familia *Daphniidae* en el lago Yahuarcocha (Steinitz-Kannan, 1979).

Sin embargo, Steinitz-Kannan, en 1983 identificó la ausencia de organismos dominantes del lago como *Daphnia pulex* reportada anteriormente (Steinitz-Kannan, 1983). Por su parte, registró la especie *Ceriodaphnia quadrangula* de la familia *Daphniidae* en el lago Yahuarcocha. Siendo la especie predominante y por primera vez reportada en los lagos andinos ecuatorianos, tomando en cuenta que su presencia podría haber sido resultado de las condiciones físico-químicas, ya que en estudios anteriores no fue reportada. En los años siguientes hasta la actualidad se ha reportado individuos del género *Daphnia*, sin embargo no se ha podido identificar la especie a la cual pertenecen (Blomme, 2014; Saelens, 2015).

Además, se debe tomar en cuenta que *Daphnia* es un organismo muy complejo ya que en presencia de depredadores modifica su morfología, desarrollando pequeñas protuberancias en la cabeza (Colbourne, Singan, & Gilbert, 2005). Igualmente,

Daphnia pulex es muy similar a *Daphnia pulicaria* compartiendo algunas características como forma del pecten medio, procesos abdominales densamente pubescentes siendo una característica que la separa a *D. pulex* de otras especies excepto de *D. pulicaria*, así como tamaño de las hembras, además se encuentran dentro del mismo grupo de clasificación “grupo pulex” (Witty, 2004).

Por lo cual se hace necesario corroborar los resultados morfológicos, mediante análisis molecular. Mediante el empleo de primers específicos de *Daphnia pulex* se amplificó ADN de *Daphnia* de Yahuarcocha amplificando bandas de 500 pb del fragmento conservado del gen COX1 (citocromo c oxidasa subunidad I. Según Wang, Zhang, Den, Zhang, & Peng, (2016) el aumento de actividades humanas, así como los cambios ambientales pueden conducir a cambios en la diversidad genética de cladóceros. Para lo cual, analizó la diversidad genética y filogenia de *Daphnia pulex* mediante el empleo de marcadores moleculares *16S* rDNA, *CO I* y los genes *18S*, concluyendo que *D. pulex* evolucionó en dos ramas en los árboles filogenéticos, lo que indica que *D. pulex* puede haber evolucionado en diferentes subespecies (Wang et al., 2016). Sin embargo, nuestro análisis no nos brinda mayor información sobre la diversidad genética y filogenia de *Daphnia* del lago Yahuarcocha, por lo cual se hace necesario aplicar en un futuro metodologías aplicando los genes *16S* rDNA, *CO I* y *18S* para la identificación de subespecies y reconstrucción de filogenia.

Por otra parte, a partir de los hallazgos encontrados en el análisis fisicoquímico, se deduce que existe una mayor concentración de plomo en los alrededores del lago Yahuarcocha (muelle y planta de tratamiento). En especial en el muelle debido a que en el año 2014 una draga del Municipio de Ibarra se hundió en el muelle del lago, derramando 20 galones de diésel y 7 de aceite para motores (Ecuavisa, 2014). El aceite de motores puede contener plomo por corrosión de cojinetes en motores que son almacenados con aceite semi-usado, provocando la formación de ácidos que producen la corrosión (Rufasto, 2019). Según Salcedo, 2019 las concentraciones de plomo en Yahuarcocha también podrían deberse a las actividades turísticas realizadas en el lago como paseo en lancha que utiliza un

motor de dos tiempos (gasolina y diésel) y competencias en los circuitos del autódromo donde no existe un sistema de recolección de aceites ni de hidrocarburos que son arrojados a las cunetas que conducen al lago Yahuarcocha (Salcedo, 2019).

Terneus, (2014) igualmente hace referencia a que la de la pista automovilística asentada en los alrededores de la laguna podría influenciar en la presencia de plomo en el lago Yahuarcocha (Terneus, 2014).

Sin embargo, en otras investigaciones también se han encontrado concentraciones de plomo en puntos diferentes al muelle. Así por ejemplo, Malitaxi en su investigación realizada en el lago Yahuarcocha en 2016, encontró concentraciones de plomo y cadmio en muestras de agua tomadas dentro del lago (muestreadas en los puntos entrada de agua del río Tahuando, quebrada Manzano Huaico y salida de agua del lago). Además, en esta misma investigación, los valores de plomo y cadmio en hígado y músculo de tilapia sobrepasaron los límites permitidos por la norma INEN NTE 0183:2014. Aunque analizaron los afluentes que ingresan al lago y se encontraron dentro de los límites permisibles de metales para agua de uso en riego, según la norma ecuatoriana (Malitaxi, 2016).

De igual manera, Oquendo, 2016 realizó análisis de espectrofotometría a *Typha latifolia* muestreada frente a la planta de tratamiento y en la estación de bomberos, determinando que las muestras se encontraban contaminadas por plomo (Oquendo, 2016). Además, el Instituto Nacional de Pesca (INP) realizó un estudio del cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) introducido en el lago Yahuarcocha, indicando la presencia de cantidades de plomo, mercurio y cadmio en concentraciones considerables en la musculatura de los animales (El Universo, 2014).

Por lo cual se deduce que las actividades realizadas en los alrededores del lago también influyen en el aumento de elementos tóxicos, como el uso de pesticidas y plaguicidas por parte de los agricultores en los alrededores del lago, además de derrames de lubricantes y combustibles (Oquendo, 2016). Así como también las actividades de pesca ya que las plomadas de pesca cuando se exponen al agua

producen óxido de plomo, carbonatos de plomo y otros compuestos (Malitaxi, 2016). Hay que mencionar además, que los caudales que llegan a Yahuarcocha en especial el perteneciente al río Tahuando se encuentra contaminado por diversos productos industriales, derivados de hidrocarburos procedentes de descargas de lubricadoras y estaciones de gasolina, así como por pesticidas, productos químicos y detergentes procedentes de la actividad antropogénica del sector (Chiriboga, 2010)

Debido a los antecedentes mencionados del lago Yahuarcocha, se cree que una vez que ingresan los metales al lago se acumulan en los sedimentos (Rivera et al., 2005). Donde más tarde los metales pesados se resuspenden en la columna de agua con el oleaje del lago convirtiéndose en formas químicas biodisponibles, provocando intoxicaciones crónicas o agudas en los organismos. Así como también los metales se pueden acumular en los organismos de los estratos más bajos e incrementar su toxicidad a lo largo de la cadena alimenticia.

En cuanto a los parámetros físico-químicos como T°, OD, Conductividad y pH, se observó que las unidades de todos estos parámetros aumentaban en el punto profundo. La importancia del análisis de los parámetros físico-químicos radicó en examinar el efecto de los parámetros sobre los organismos, así como también comparar con investigaciones previas en Yahuarcocha. Por lo que el OD presentó valores <6 mg/L, no obstante se considera que *Daphnia pulex* es resistente a bajas concentraciones de OD como respuesta a la adaptación incrementa la síntesis de hemoglobina cuando las condiciones de oxigenación son limitantes, lo que da a los individuos una coloración roja, alargando el tiempo de vida de los organismos, aumentando la velocidad de alimentación y natación. Además, acelera la producción de huevos y desarrollo embrionario (Vazquez, Solis, Macedo, & Rosas, 1986). Dicha característica fue evidente en los organismos de *Daphnia* recién muestreados en el lago, no obstante una vez en el laboratorio perdían la coloración rojiza ya que se los mantuvo con valores de OD >6 mg/L en agua reconstituida.

Por otra parte, el pH presentó valores alcalinos en todos los puntos, sin embargo según Vazquez et al., (1986) parece no ser un factor limitante para *Daphnia pulex* ya que se encuentra en un amplio rango de valores y el intervalo óptimo de pH para la especie en ambientes naturales sería de 7.40 a 8.30, siendo el punto profundo el único que presenta valores sobre este rango.

Mientras que la T° mantuvo un rango entre 20-22°C encontrándose dentro del nivel de ocurrencia para la especie en ambientes naturales según Vazquez et al., (1986). Según Rojas, Navarrete, Elías, & Contreras, (1999) la temperatura es el factor más relevante en el incremento y tamaño de las poblaciones de cladóceros (Rojas et al., 1999). Por lo cual al variar se ve afectado el número de organismos *Daphnia* en los sistemas acuáticos. En cuanto a la turbidez y la conductividad fue mayor en el punto profundo. Estos valores guardan relación con el trabajo de Ochoa, 2017, donde se observó que los parámetros variaban de mes a mes presentando algunas veces el muelle los valores más altos tanto de T°, OD, Conductividad y pH (Ochoa, 2017).

Por otra parte según Salcedo, 2019 existe una relación entre los metales, el pH y la conductividad, debido a que los metales actúan como aniones en los ecosistemas llegando a formar sales. Por lo cual, si existe un exceso de metales provocara un incremento en la conductividad y pH, en consecuencia, la variación de estos dos valores será proporcional a la concentración de metales pesados en Yahuarcocha (Salcedo, 2019). Sin embargo en ese mismo estudio se realizó una correlación de plomo con conductividad y pH, obteniendo resultados no significativos en el estudio (Salcedo, 2019).

Debido a la incidencia de plomo en Yahuarcocha se sometió a *Daphnia pulex* a diferentes concentraciones de este metal, para lo cual primeramente se sometió a diferentes concentraciones de dicromato de potasio como tóxico de referencia. La concentración letal media (CL₅₀) de dicromato de potasio fue 0.45 ppm. Estos resultados guardan relación con los trabajos de Bernal & Rojas, (2007), donde se halló una CL₅₀ 0.33 ppm empleando *Daphnia pulex*, encontrándose nuestro valor entre el límite superior e inferior de esa investigación. Sin embargo, no guardan

relación con el trabajo de Sierra & Zárate, (2008) donde emplearon *Daphnia magna* como bioindicador, ya que encontraron una CL₅₀ 1.05 ppm de dicromato de potasio. Este valor se ubica por encima de la CL₅₀ hallada en esta investigación.

Además, se realizó la prueba estadística análisis de la varianza ANOVA para determinar si existían o no, diferencias significativas en las mortalidades de los diferentes tratamientos. Concluyendo que las diferentes concentraciones de dicromato de potasio producen efectos distintos en los organismos prueba en la variable mortalidad. Debido al resultado significativo del ANOVA, se realizó pruebas Tukey para determinar los tratamientos que difieren significativamente entre sí. Mismo que mostró que existen cinco rangos de significancia. En el primer rango de significancia se ubicó la concentración de 1.20 ppm de dicromato de potasio con una tasa de mortalidad de 5 individuos. En comparación con la investigación de Sierra & Zárate, (2008) donde se observó mortalidad de todos los organismos (5 individuos) a una concentración de 1.50 ppm de dicromato de potasio, *Daphnia pulex* de Yahuarcocha presenta mayor sensibilidad.

Por otra parte, en la presente investigación se obtuvo una CL₅₀ de 0.25 ppm de plomo, mientras que Velandia & Montañez, (2010) encontraron una CL₅₀ de plomo de 0.43 ppm empleando *Daphnia pulex* como bioindicador. Dichos resultados muestran que *Daphnia pulex* de Yahuarcocha presentó una mayor sensibilidad. Según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos ((EPA-821-R-02-012, 2002) la sensibilidad de los organismos dependerá de la edad de cultivo de los organismos, de la calidad de agua de dilución para los tóxicos, así como de la especie o cepa empleada y de parámetros como temperatura, OD, y alimento suministrado. Por lo cual, se cree que *Daphnia pulex* de Yahuarcocha es más sensible debido al tiempo de cultivo de los organismos ya que se los mantuvo durante aproximadamente 1 año en condiciones estables de laboratorio, mientras que en la investigación citada los organismos empleados no tuvieron un tiempo considerable de cultivo. De igual manera, en la investigación de Sierra & Zárate, (2008), la CL₅₀ de nitrato de plomo Pb(NO₃)₂ fue de 9.49 ppm, encontrándose muy por encima de la concentración letal media hallada en esta investigación.

Por otra parte el ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones de plomo en la variable mortalidad de *Daphnia pulex*. Por lo cual se realizó la prueba Tukey a fin de determinar la concentración a la cual no se observa un efecto nocivo del plomo sobre el organismo expuesto, y la concentración a la cual se observa un efecto tóxico. Misma que mostró que existen cinco rangos de significancia, la concentración a la cual se observa mortalidad en todos los organismos (5 individuos) fue 0.7 ppm de plomo. Mientras que en la investigación realizada por Velandia & Montañez, (2010), se observó que se morían todos los organismos (5 individuos) a una concentración de 1 ppm. Además, a una concentración de 0.7 ppm solo se morían un promedio de 4 individuos en la investigación citada. De igual manera en nuestra investigación a una concentración de 0.05 ppm de plomo ya se empezó a observar mortalidad en los organismos, mientras que la investigación de Velandia & Montañez, (2010) recién se observó mortalidad a una concentración de 0.1 ppm. Por lo cual, una vez más se confirma que *Daphnia pulex* de Yahuarcocha presenta mayor sensibilidad.

Por su parte, los resultados de las pruebas probit realizadas con muestras del lago Yahuarcocha mostraron una CL_{50} de 55.19% V/V en el punto profundo, lo cual indica que a una dilución del 50.19% de agua del punto profundo se morirán el 50% de organismos. Esto muestra que existe una carga tóxica en las muestras de agua del lago, debido a la posible presencia de plomo, ya que los parámetros físico-químicos como pH, T° y OD se encontraban dentro de los niveles aptos para el desarrollo de *Daphnia*.

Igualmente el muelle mostró una CL_{50} de 37.83% V/V, lo cual indica que a una dilución del 37.83% de agua del muelle se morirán el 50% de organismos. Esto muestra que al igual que en el punto profundo existe una carga tóxica en las muestras de agua del muelle. Sin embargo, la carga tóxica sería mayor ya que se necesita una menor concentración de agua para que se produzca muerte en el 50% de organismos en un periodo de 40 horas. Además, todos los resultados de las pruebas probit tanto del muelle como del punto profundo se encontraron cerca al

promedio lo que indica que los resultados se mantuvieron constantes sin interferencias que alteren la sensibilidad o el comportamiento de los organismos, lo cual muestra confiabilidad en los resultados obtenidos.

Finalmente, el análisis de varianza ANOVA permitió comprobar que a diferentes concentraciones de las muestras ambientales se presentan diferentes efectos toxicológicos tanto en el punto profundo como en el muelle. Por otra parte, mediante la prueba Tukey se determinó que la dilución a la cual se empieza a observar efectos de mortandad en los organismos fue en el último rango de 20% de dilución en ambos puntos. Sin embargo, en el punto profundo se observó una mortalidad de 0.33 individuos, mientras que en el muelle se determinó una mortalidad más alta de 1.08 individuos. Por otra parte, se observó una mortandad en todos los organismos en la muestra que no fue sometida a ninguna dilución (100%) en ambos puntos.

En base a esta comparación *Daphnia pulex* presentó una notable sensibilidad a tóxicos, considerándola un buen indicador biológico, tras mantenerla en cultivo por aproximadamente un año. Por lo que *Daphnia pulex* representa un organismo de interés en el área de la ecología debido a su sensibilidad de respuesta al estrés ambiental.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Los niveles de plomo encontrados en el análisis fisicoquímico de las aguas del lago Yahuarcocha, son válidos únicamente para las coordenadas específicas en las cuales fueron levantados los datos.
- Los resultados del análisis físico-químico y ensayos de toxicidad indican que el muelle presenta una mayor contaminación.
- El gen COX1 (citocromo c oxidasa subunidad I) posee un fragmento conservado para la identificación de la especie *Daphnia pulex*. Se validaron protocolos para la toma de muestras ambientales, aislamiento de ADN de muestras de tejido y de muestras ambientales, y condiciones óptimas de PCR, dando como resultado la detección de la especie *Daphnia pulex* en el lago Yahuarcocha.
- *Daphnia pulex* presentó una notable sensibilidad a tóxicos, considerándola un buen indicador biológico, tras mantenerla en cultivo por aproximadamente un año.
- Los resultados obtenidos de CL50 tanto de dicromato como de plomo se encuentran dentro de los rangos establecidos por investigaciones realizadas con anterioridad.

- Es necesario llevar a cabo nuevas investigaciones a nivel crónico o subcrónico para saber en detalle los efectos del plomo sobre el organismo de los individuos en estudio.

5.2 Recomendaciones

- A fin de preservar la ecología acuática del lago Yahuarcocha, es importante mantener un monitoreo constante del lago, realizando análisis fisicoquímicos de la concentración de metales pesados en el agua del lago en las tres diferentes épocas del año, así como también de los sedimentos del lago ya que estos absorben y liberan contaminantes a la columna de agua.
- Bajo este resultado del análisis fisicoquímico del cuerpo de agua del lago, se hace necesario la sugerencia de aplicar un tratamiento al cuerpo de agua, para la remoción de plomo. De igual manera se recomienda realizar un análisis de las actividades realizadas en los alrededores del lago, a fin de minimizar su impacto.
- Se recomienda en un futuro aplicar metodologías como *16S* rDNA, *CO I* y *18S* para la identificación de subespecies y reconstrucción de filogenia de *Daphnia pulex* del lago Yahuarcocha.
- Los bioensayos de toxicidad deben ampliarse a otros sectores como vertientes, ríos, y en diferentes contaminantes, a fin de diagnosticar tempranamente los posibles impactos ambientales que se puedan ocasionar a los cuerpos de agua.
- Se recomienda realizar bioensayos con otros indicadores de toxicidad, para así poder analizar y comparar los datos hallados del plomo en la presente investigación.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- ABNT NBR 12713. (2016). *Ecotoxicología acuática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera)* (Cuarta edi). Río de Janeiro. Retrieved from <https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/fitossanidade/joaquimgoncalvesmachadoneto/nbr12713-2016-toxic-aguda-daphnia.pdf>
- Agudelo, E., Gaviria, L., Barrios, L., & Cardona, S. (2018). Techniques to determine toxicity in industrial wastewater contaminated with dyes and pigment. *DYNA (Colombia)*, 85(207), 10. <https://doi.org/10.15446/dyna.v85n207.71915>
- Arroyave, M. (2004). La lenteja de agua (Lemma minor L.) una planta acuática promisoría. *EIA*, (1). Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-12372004000100004
- Athanasio, G., Chipman, J., Viant, M., & Mirbahai, L. (2016). Optimisation of DNA extraction from the crustacean *Daphnia*. *PeerJ*, 4, e2004. <https://doi.org/10.7717/peerj.2004>
- Barrios, A., Calderon, C., Ortega, A., Cota, T., Negrete, A., & Rubo, O. (2007). *XVIII Congreso de Investigación. Daphnia magna. El canario de las aguas*. Morelos. Retrieved from <http://acmor.org.mx/cuam/biol/217daphnia.pdf>
- Bernal, A., & Rojas, A. (2007). *Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del mercurio por medio de bioensayos de toxicidad acuática sobre Daphnia Pulex*. Universidad de la Salle. Retrieved from <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/14946/41012014.pdf?sequence=1>
- Blomme, J. (2014). *General limnology and zooplankton ecology of two tropical high altitude lakes in Northern Ecuador: Mojanda & Yahuarcocha*. KU Leuven.
- Brown, T. (2008). *Genomas*. (Ed. Médica Panamericana, Ed.). Buenos Aires. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=4tYIcMOdsBwC&dq=Reacción+en+>

cadena+de+la+polimerasa+PCR&hl=es&source=gbs_navlinks_s

- Cabrera, S. (2015). *Análisis temporal y espacial de comunidades zooplanctónicas en los lagos andinos: Yahuarcocha y Mojanda, Ecuador*. Universidad Técnica del Norte.
- Caicedo, F. (2015). *Evaluación de la dinámica poblacional del fitoplancton con relación a las características físico-químicas del lago altoandino Yahuarcocha*. Universidad Técnica del Norte.
- Castillo, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. (IMTA, Ed.). México.
- CETESB L5.018. Água e teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis Claus*, 1876 (Cladocera, Crustacea) (1994). São Paulo.
- Chiriboga, C. (2010). *Propuesta de un sistema de monitoreo para la caracterización de las aguas residuales que receipta el río Tahuando*. Universidad Técnica del Norte. Retrieved from <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/151>
- Colbourne, J., Pfrender, M., Gilbert, D., Thomas, W., Tucker, A., Oakley, T. H., ... Boore, J. L. (2011). The Ecoresponsive Genome of *Daphnia pulex*. *Science*, 331(6017), 555–561. <https://doi.org/10.1126/science.1197761>
- Colbourne, J., Singan, V., & Gilbert, D. (2005). wFleaBase: the *Daphnia* genome database. *BMC Bioinformatics*, 6, 45. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-45>
- Contreras, A., & Molero, M. (2011). *Ciencia y tecnología del medioambiente*. Madrid: UNED - Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Cristescu, M. E. A., Colbourne, J. K., Radivojac, J., & Lynch, M. (2006). A microsatellite-based genetic linkage map of the waterflea, *Daphnia pulex*: On the prospect of crustacean genomics. *Genomics*, 88(4), 415–430. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2006.03.007>
- Cruz, F. (2013). Efecto de la contaminación por metales pesados en los ecosistemas costeros del suroeste de México. *KUXULKAB*, 19(37), 65–68. Retrieved from <http://ri.ujat.mx/bitstream/20.500.12107/2315/1/-351-274-A.pdf>
- Curtis, H. (2008). *Curtis Biología*. (Ed. Médica Panamericana, Ed.). Santiago de Chile. Retrieved from

https://books.google.com.ec/books?id=mGadUVpdTLsC&dq=Reacción+en+cadena+de+la+polimerasa+PCR&hl=es&source=gbs_navlinks_s

Daza, L. (2018). *Uso del gen Citocromo Oxidasa I (COI) y código de barra en estudios de genética y biología molecular para la identificación de especies animales*. Universidad Nacional abierta y a distancia. Retrieved from <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/21038/1049620140.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

De la cruz, N., Alderete, A., & Laffón, S. (2013). Accumulation of heavy metals in sediments of mangrove ecosystem in Laguna de Terminos, Campeche, Mexico. *Redalyc*, 15(1), 25–30. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49728291003>

Díaz-Báez, M. C., López, M. C. B., & Ramírez, A. J. E. (2004). *Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos*. Univ. Nacional de Colombia.

Ecuavisa. (2014, August 26). 10% de la laguna de Yahuarcocha contaminada tras hundimiento de draga. Retrieved from <https://www.ecuavisa.com/articulo/noticias/nacional/77565-10-laguna-yahuarcocha-contaminada-tras-hundimiento-draga>

El Universo. (2014, January 21). Langostas de lago Yahuarcocha, con alto nivel de metales. Retrieved from www.eluniverso.com/noticias/2014/01/21/nota/2064291/langostas-lago-alto-nivel-metales

EPA-821-R-02-012. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms (2002). Retrieved from https://www.wbdg.org/FFC/EPA/EPACRIT/epa821_r_02_012.pdf

Eróstegui, C. (2009). Contaminación por metales pesados. *Revista Científica Ciencia Médica*, 12(1), 45–46.

Fairchild, J. F., Ruessler, D. S., Haverland, P. S., & Carlson, A. R. (1997). Comparative Sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to Sixteen Herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34(4), 353–357. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007/s002449900196>

Gamez, C., & Ramirez, E. (2008). *Determinación de la concentración letal media*

- (CL50-48) del herbicida roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*. Universidad de la Salle. Retrieved from <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/14062/T41.08G145d.pdf?sequence=1>
- Garcés, R. (2013). *Implementación de una técnica biológica para determinar niveles de toxicidad aplicando Daphnia magna (Crustácea: Cladóceros) en el agua de vertiente utilizada en el sector de huachi la libertad*. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Bioquímica. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/6639>
- Geng, X., Cheng, R., Xiang, T., Deng, B., Wang, Y., Deng, D., & Zhang, H. (2016). The complete mitochondrial genome of the Chinese *Daphnia pulex* (Cladocera, Daphniidae). *ZooKeys*, 615, 47–60. <https://doi.org/10.3897/zookeys.615.8581>
- Gerrero, G., Rico, R., & Silva, M. (2017). Monitoreo de una planta tratadora de aguas residuales mediante pruebas de toxicidad aguda con el cladóceros *Daphnia magna* y el rotífero de agua dulce *Lecane quadridentata*. *Hidrobiológica*, 27(1). Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972017000100087
- Gutierrez, M., & Gagnetten, A. (2011). Efecto de los metales sobre microcrustáceos de agua dulce. Avances metodológicos y potencialidad de cladóceros y copépodos como organismos test. *Revista Peruana de Biología*, 18(3), 389–396. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332011000300022&script=sci_arttext
- Gutiérrez, S. (2006). *Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología*. (Pontificia Universidad Javeriana, Ed.). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Odontología. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=4szLuVOtgC0C&dq=Reacción+en+cadena+de+la+polimerasa+PCR&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Haney, J., Aliberti, M., Allan, E., Bauer, D., Beagen, W., & Bradt, S. (2013). An Image-based Key to the Zooplankton of North America. *University of New Hampshire*. Durham: Center for Freshwater Biology. Retrieved from

<http://cfb.unh.edu/cfbkey/html/index.html>

- Hernández, O. (2009). *Estudio de contaminantes ecotóxicos en agua y organismos acuáticos del Lago de Atitlán*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Retrieved from https://www.academia.edu/9001497/Estudio_de_contaminantes_ecotóxicos_en_agua_y_organismos_acuáticos_del_Lago_de_Atítlán
- Hidalgo, C., & Osorio, E. (2013). *Evaluación y determinación de la capacidad secuestrante de los metales pesados cromo (Cr) y cadmio (Cd) por taxas de mohos aisladas de los alrededores de los ríos Cutuchi y Machángara*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Isch, E. (2011). *Contaminación de las aguas y políticas para enfrentarla* (Primera). Quito: CAMAREN.
- ISO 6341. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test, Pub. L. No. ISO 6341:2012 (E) (2012). Retrieved from <https://www.sis.se/api/document/preview/915426/>
- Jiménez, D. (2012). *Cuantificación de metales pesados (Cadmio, cromo, níquel y plomo) en aguas superficiales, sedimentos y organismos (Crassostrea columbiensis) ostion de mangle en el puente portete del estero salado (Guayaquil)*. Universidad de Guayaquil. Retrieved from [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1683/1/Cuantificación de metales pesados %28Cadmio%2C cromo%2C níquel y plomo%29 en agua superficial%2C sedimentos y organismos... Jiménez%2C David.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1683/1/Cuantificación_de_metales_pesados_%28Cadmio%2C_cromo%2C_níquel_y_plomo%29_en_agua_superficial%2C_sedimentos_y_organismos..._Jiménez%2C_David.pdf)
- Jiménez, M. (2015). *Estudio de microcrustáceos (Daphnia pulex y Artemia salina) como indicadores de toxicidad por causa del dicroato de potasio en la cuenca alta del río Bogotá*. Universidad Militar Nueva Granada. Retrieved from [http://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/10654/6590/3/Trabajo seminario de grado.pdf](http://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/10654/6590/3/Trabajo_seminario_de_grado.pdf)
- Lara, D. (2015). *Ordenamiento de las actividades deportivas, recreativas y de alimentación que se realizan en la Laguna de Yahuarcocha del cantón Ibarra*. Ibarra. Retrieved from <http://documents.worldbank.org/curated/en/385031467994627068/pdf/SFG1>

358-V3-SPANISH-P147280-Box393224B-PUBLIC-Disclosed-10-8-2015.pdf

- Londoño, F., Londoño, P., & Muñoz, F. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2). Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v14n2/v14n2a17.pdf>
- López, L. (2009). *Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del cloro en el efluente de una industria tipo mediante bioensayos de toxicidad acuática utilizando Daphnia pulex*. Universidad de la Salle.
- Madrigal, A., Vázquez, G., Velasco, V., & Rodríguez, P. (2015). Determinación de Metales Pesados (Pb, Hg, Cd y As), en Agua de Mar y Ostión (*Crassostrea iridiscens*) en la Costa del Estado de Colima., 18(2), 122–130. Retrieved from linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1405888X15000170
- Malitaxi, D. (2016). *Evaluación de metales pesados plomo (Pb) y cadmio (Cd) en la especie tilapia (Tilapia mossambica), como bioindicador de calidad de agua, mediante técnicas de absorción atómica, en la laguna de Yahuarcocha, provincia de Imbabura*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra.
- Mandonx, T. (2014). *Trophic status and phytoplankton ecology of two lakes in northern Ecuador: Yahuarcocha & Mojanda*. Belgium.
- Maridueña, A., Chalén, N., Coello, D., Cajas, J., Elías, E., Solís, P., & Aguilar, F. (2011). Mortandad de peces en la laguna de Yahuarcocha, cantón Ibarra, provincia de Imbabura. Febrero 2003. Retrieved from <https://www.oceandocs.org/handle/1834/4501>
- Márquez, A., Senior, W., Fermín, I., Martínez, G., Castañeda, J., & González, Á. (2008). Cuantificación De Las Concentraciones De Metales Pesados En Tejidos De Peces Y Crustáceos De La Laguna De Unare, Estado Anzoátegui, Venezuela. *FCV-LUZ*, 18(1), 73–86.
- Martí, M. A. C. (2007). *Principios de ecotoxicología: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente*. Editorial Tebar.
- Martorell, J. (2010). *Biodisponibilidad de metales pesados en dos ecosistemas acuáticos de la costa suratlántica andaluza afectados por contaminación*

- difusa*. Universidad de Cádiz. Retrieved from https://rodin.uca.es/xmlui/bitstream/handle/10498/15776/Tes_2010_06.pdf;jsessionid=E8E33EBFBD8EA829C6A999A74B17A817?sequence=1
- NMX-AA-051-SCFI. Análisis de agua - medición de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas - método de prueba (2016). México. Retrieved from <http://www.economia-nmx.gob.mx/normas/nmx/2010/nmx-aa-051-scfi-2016.pdf>
- NMX-AA-087-SCFI. Análisis de agua- Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, Straus (Crustacea-Cladocera)- Método de prueba, Norma mexicana § (2010).
- Ochoa, M. (2017). *Evaluación del crecimiento de cianobacterias en relación a los parámetros físico-químicos del agua en el lago Yahuarcocha*. Universidad Técnica del Norte. Retrieved from http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/7586/1/03_RNR_259_TRABAJO_DE_GRADO.pdf
- Oquendo, J. (2016). *Evaluación de Typha latifolia en la absorción de plomo y propuesta de fitorremediación de aguas residuales con metales pesados en la laguna de Yahuarcocha*. Universidad Internacional SEK. Retrieved from http://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/1606/1/Tesis_Final_Renato_Oquendo.pdf
- Orta, L. (2002). Contaminación de las aguas por plaguicidas químicos. *Redalyc*, 6(3).
- Pentreath, V., González, E., Barquín, M., Ríos, S., & Perales, S. (2015). Bioensayo de toxicidad aguda con plantas nativas para evaluar un derrame de petróleo. *Rev. Salud Ambiental*, 15(1), 13–20. Retrieved from <https://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/viewFile/551/668>
- Pérez, I., Garatachia, V., García, A., & Rubio, I. (2017). Evaluación de la sensibilidad del cladócero tropical *Ceriodaphnia cornuta* a metales pesados. *Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(1), 49–56. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.01.04>
- Portilla, K. (2015). *Evaluación del comportamiento de los parámetros físicos del agua, para determinar el estado trófico del lago Yahuarcocha, provincia*

Imbabura. Ibarra.

- Posada, M., & Arroyave, M. (2006). Efectos del mercurio sobre algunas plantas acuáticas tropicales. *EIA*, (6), 57–67. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-12372006000200006
- Rivera, F., Gutiérrez, A., Val, R., Mejía, R., Sánchez, P., Aparicio, J., & Díaz, L. (2005). *La medición de sedimentos en México* (IMTA-UJAT,). México.
- Rojas, M., Navarrete, N., Elías, G., & Contreras, G. (1999). Efecto de jugos vegetales sobre la producción de *Daphnia pulex* (Cladocera: Daphnidae) en condiciones de laboratorio. *Revista de Biología Tropical*, 47(3). Retrieved from https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77441999000300016
- Rufasto, E. (2019). *Diseño de un sistema de medición de viscosidad del aceite de un motor de combustión interna en vehículos livianos*. Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo. Retrieved from http://tesis.usat.edu.pe/bitstream/20.500.12423/2190/1/TL_RufastoVargasEddie.pdf
- Saelens, P. (2015). Ecological functioning of a eutrophic, high-altitude shallow lake in Ecuador, Laguna Yahuarcocha. *K.U. Leuven, Kulak*, 85.
- Salcedo, E. (2019). *Evaluación de concentración de plomo y cromo en poblaciones de Typha latifolia en la laguna de Yahuarcocha*. Universidad Técnica del Norte. Retrieved from http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/9410/2/03_RNR_323_TRABAJO_GRADO.pdf
- Santana, L. (2014). *Caracterización físico, química y ecotoxicológica de sedimentos provenientes de cuatro sitios del río Daule*. Escuela superior politécnica del litoral.
- Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo. Plan Nacional de Desarrollo 2013-2017 (2013). Ecuador. Retrieved from www.buenvivir.gob.ec
- Senior, W. (2016). *Contenido de metales pesados en organismos acuáticos expendidos en los mercados de la ciudad de Machala, provincia del Oro*. Retrieved from <https://doi.org/10.31219/osf.io/55g8x>

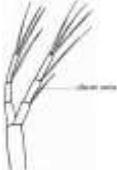
- Sharma, S. K. (2014). *Heavy metals in water : presence, removal and safety*. (Royal Society of Chemistry, Ed.). India. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=e2ooDwAAQBAJ&hl=es&source=gb_s_navlinks_s
- Sierra, M., & Zárata, A. (2008). *Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del plomo y plata en los vertimientos de una industria galvánica, mediante ensayos toxicológicos sobre daphnia magna*. Universidad de la Salle.
- Steinitz-Kannan, M. (1979). *Comparative Limnology of Ecuadorian Lakes: a study of species number and composition of plankton communities of the Galapagos Islands and the Equatorial Andes*. The Ohio State University.
- Steinitz-Kannan, M. (1983). Limnological studies in Ecuador: 1. A survey fo chemical and physical properties of Ecuadorian lakes. *ResearchGate*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/315703437_Limnological_studies_in_Ecuador_1_A_survey_fo_chemical_and_physical_properties_of_Ecuadorian_lakes
- Terneus, E. (2014). Vegetación acuática y estado trófico de las lagunas andinas de San Pablo y Yahuarcocha, provincia de Imbabura, Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 35. <https://doi.org/10.26807/remcb.v35i1-2.255>
- TULSMA. Norma de Calidad Ambiental y de descarga de efluentes : Recurso Agua, Pub. L. No. N° 028, Texto unificado de legislación secundaria del Ministerio del Ambiente 301 (2015). Retrieved from <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu112180.pdf>
- United Nations. (2005). *Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA)*. (United Nations Publications, Ed.). Naciones Unidas.
- Vargas, A., & Perea, Y. (2011). *Determinación de la concentración letal media (CL50-48), de bario e hidróxido de sodio, mediante bioensayos de toxicidad en un ecosistema, sobre Daphnia magna*. Universidad de la Salle. Retrieved from file:///C:/Users/User/Documents/vane/W/T41.11 V426d.pdf

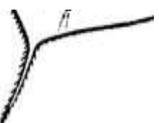
- Vazquez, A., Solis, E., Macedo, N., & Rosas, I. (1986). Influencia de la calidad del agua sobre la ocurrencia de *Daphnia pulex* en la presa José Antonio Alzate y algunos aspectos de su pesquería. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 2(1), 39–56. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37000104>
- Velandia, L., & Montañez, Y. (2010). *Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del plomo y cromo hexavalente mediante bioensayos de toxicidad acuática utilizando Daphnia Pulex*. Facultad de Ingeniería. Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Retrieved from <https://repository.lasalle.edu.co/handle/10185/14910>
- Verma, A. K., & Choudhary, A. (2017). Effect of heavy metal toxicity on Zooplankton population based on dyes and printing industries in Jodhpur (Rajasthan). *Biolife*, 5(1). <https://doi.org/10.17812/blj.2017.5112>
- Villamarín, S., Chacón, M., & Álvarez, R. (2013). Pruebas de toxicidad aguda CL (I) 50 en peces estuarinos (*Gambusia affinis*) utilizando efluentes industriales a la Bahía de Cartagena. *Biosalud*, 12(2), 24–39.
- Wang, W., Zhang, K., Den, D., Zhang, Y., & Peng, S. (2016). Genetic Diversity of *Daphnia pulex* in the Middle and Lower Reaches of the Yangtze River. *Plos One*, 11(3). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4807850/>
- Witty, L. (2004). *Practical Guide to Identifying Freshwater Crustacean Zooplankton* (2^a edition). Sudbury: Cooperative Freshwater Ecology Unit.
- Zapata, O., & Pedrero, J. (2008). Ensayos de toxicidad aguda con larvas y juveniles de los peces de tilapia, carpa y cíclidos. In P. Ramírez & A. Mendoza (Eds.), *Ensayos toxicológicos para la evolución de sustancias químicas en agua y suelo* (Instituto). México.

ANEXOS

Anexo 1

Datos de análisis morfológico de Daphnia spp. realizados en el mes de Abril como referencia a la temporada lluviosa (Noviembre-Mayo)

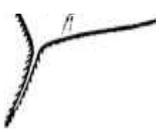
Característica	Variables	Guía	Individuos										Media
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Tamaño (mm) de la hembra	<i>D.pulex</i> : 1.1-3.5 <i>D.pulicaria</i> : 1.4-3.2		3.5	3	3	2	3	3	2.5	2.5	2.5	2.5	2.75
Nº Dientes del pecten medio	5-7 dientes <i>Daphnia pulex</i>		6	6	5	5	5	6	6	6	6	6	6
Nº Espinas anales	<i>Daphnia pulex</i> : 10-16 espinas anales		15	16	12	12	13	15	13	14	13	12	14
Vesícula óptica	Toca el margen de la cabeza		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	10
	No toca el margen de la cabeza												0
Rostro	Polígonos isodiamétricos		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	10
	Polígonos alargados												0
Antena	Segunda seta natatoria corta												0

Garra post-abdominal	Segunda seta natatoria larga		x	x	x	x	x	X	x	x	x	x	10
	Pecten medio, distal y proximal uniformes												0
	Pecten medio con dientes desarrollados más		x	x	x	x	x	X	x	x	x	x	10
	Dientes del pecten medio de tamaño intermedio												0
Procesos abdominales	Segundo proceso abdominal corto, densamente pubescentes (<i>D. Pulicaria</i>)												0
	Segundo proceso abdominal largo, densamente pubescentes (<i>D. Pulex</i>)		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	10
Espina caudal	Corta		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	10
	Larga												0

Anexo 2

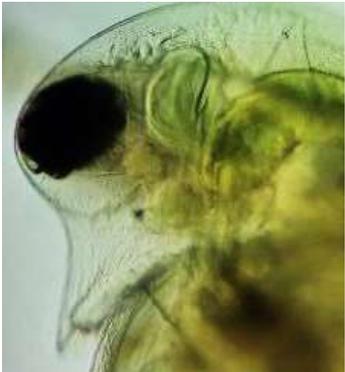
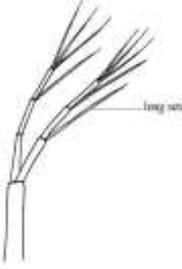
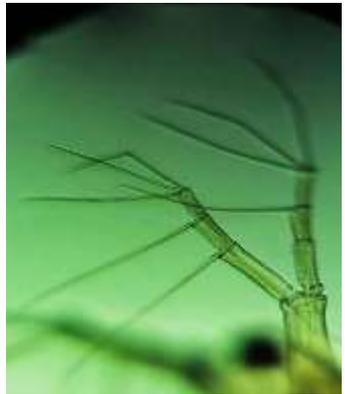
Datos de análisis morfológico de Daphnia spp. proveniente del lago Yahuarcocha tomados en el mes de Agosto como referencia a la temporada seca

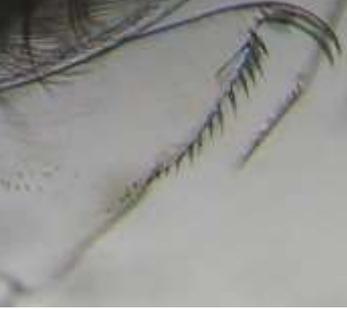
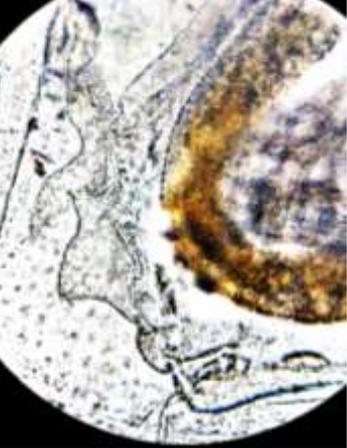
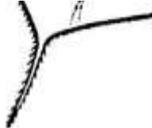
Característica	Variables	Guía	Individuos										Media
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Tamaño (mm) de la hembra	<i>D.pulex</i> : 1.1-3.5 <i>D.pulicaria</i> : 1.4-3.2		3	2.5	3	2.5	2.5	3	3	2.5	2.5	2	2.65
Nº Dientes del pecten medio	5-7 dientes <i>Daphnia Pulex</i>		6	5	6	6	6	6	5	5	6	6	6
Nº Dentículos anales	<i>Daphnia pulex</i> : 10-16 espinas anales		12	14	12	11	15	13	12	11	11	13	12
Vesícula óptica	Toca el margen de la cabeza		x	x	x	x	X	x	x	x	x	x	10
	No toca el margen de la cabeza												0
Rostro	Polígonos isodiamétricos		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	10
	Polígonos alargados												0
Antena	Segunda seta natatoria corta												0
	Segunda seta natatoria larga		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	10

	Pecten medio, distal y proximal uniformes																			0
Garra post-abdominal	Pecten medio con dientes más desarrollados		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	10
	Dientes del pecten medio de tamaño intermedio																			0
Procesos abdominales	Segundo proceso abdominal corto, densamente pubescentes (<i>D. Pulicaria</i>)																			0
	Segundo proceso abdominal, densamente pubescentes largo (<i>D. Pulex</i>)		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	10
Espina caudal	Corta		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	10

Anexo 3

Comparación estructural de características dicotómicas de Daphnia pulex con Daphnia spp. proveniente del lago Yahuarcocha

Característica	Descripción	Guía	Muestras
Tamaño (mm) de la hembra	<i>D.pulex</i> : 1.1-3.5 <i>D.pulicaria</i> : 1.4-3.2	 <p>Female</p>	
Vesícula óptica	Toca el margen de la cabeza		
Rostro	Polígonos isodiamétricos		
Antena	Segunda seta natatoria larga	 <p>long seta</p>	

Garra postabdominal	Pecten medio con dientes más desarrollados		
Nº Dientes del pecten medio	5-7 dientes <i>Daphnia pulex</i>		
Nº Dentículos anales	<i>Daphnia pulex</i> : 10-16 espinas anales		
Procesos abdominales	Segundo proceso abdominal largo pubecente <i>(D.Pulex)</i>		
Espina caudal	Corta		

Anexo 4

Pruebas de toxicidad para Daphnia magna con dicromato de potasio

N° Ensayo	CL50	Límite inferior	Límite superior
1	0.193	0.136	0.252
2	0.254	0.192	0.324
3	0.313	0.233	0.412
4	0.222	0.173	0.279
5	0.196	0.139	0.257
6	0.191	0.096	0.273
7	0.236	0.179	0.300
8	0.193	0.136	0.252
9	0.198	0.152	0.253
10	0.265	0.202	0.338
Promedio	0.226	0.164	0.294

Nota: Mediante el programa estadístico probit se determinó la concentración letal media del dicromato de potasio en *Daphnia magna*, donde nos da a conocer el límite superior e inferior con un 95% de confianza. El Anexo 4 nos muestra el promedio de resultados definitivos obtenidos, donde se puede observar que los valores de la CL 50-48 para todos los ensayos se encuentran dentro de los límites calculados, y oscilan entre el mismo rango. La carta control presenta un promedio de límite inferior de 0.16 µg/l, un promedio de límite superior de 0.29 µg/l y CL₅₀ promedio de 0.226 µg/l.

Anexo 5

Carta control de plomo con Daphnia magna

N° Ensayo	CL50	Límite inferior	Límite superior
1	0.211	0.136	0.278
2	0.249	0.181	0.316
3	0.227	0.152	0.296
4	0.271	0.205	0.339
5	0.253	0.188	0.320
6	0.246	0.181	0.311
7	0.256	0.190	0.321
8	0.185	0.111	0.250
9	0.263	0.194	0.332
10	0.208	0.123	0.281
Promedio	0.237	0.166	0.304

Nota: Se determinó la concentración letal media del plomo mediante análisis probit, donde nos da a conocer el límite superior e inferior con un 95% de confianza. El Anexo 5 nos muestra el promedio

de resultados definitivos obtenidos, donde se puede observar que los valores de la CL 50-48 para todos los ensayos se encuentran dentro de los límites calculados, y oscilan entre el mismo rango.

Anexo 6

Carta control de muestra ambiental con Daphnia magna

Punto profundo			
Nº Ensayo	CL50	Límite inferior	Límite superior
1	41.417	31.431	49.474
2	48.474	39.655	56.270
3	42.806	33.856	50.432
Promedio	40.574	29.147	49.100
Muelle			
Nº Ensayo	CL50	Límite inferior	Límite superior
1	31.728	17.853	40.648
2	24.914	8.361	33.849
3	17.452	39.816	45.338
Promedio	35.338	28.589	46.444

Nota: Se determinó la concentración letal media de la muestra ambiental mediante análisis probit, donde nos da a conocer el límite superior e inferior con un 95% de confianza. El anexo 6 nos muestra el promedio de resultados definitivos obtenidos, donde se puede observar que los valores de la CL 50-48 para todos los ensayos se encuentran dentro de los límites calculados, aunque las muestras de cada punto no oscilan entre el mismo rango.

Anexo 7.

Reporte de pruebas de sensibilidad con el tóxico de referencia Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) con *Daphnia pulex*

No Prueba	Fecha	Concentración ppm	Replicas				Medidas finales		Total muertos	% de mortalidad	Fecha 48h
			1	2	3	4	OD	PH			
Preliminar	Septiembre	Blanco	0	0	0	0			0	0	Octubre
		0.001	0	0	0	0			0	0	
		0.01	0	0	0	0			0	0	
		0.1	0	1	1	0	6-8	7-8	2	0.1	
		1.0	5	5	5	5			20	1	
		5.0	5	5	5	5			20	1	
1	06/11/2017	Blanco	0	0	0	0			0	0	08/11/2017
		0.1	0	2	0	1			3	0.15	
		0.5	2	3	3	3	6.2	7.9	11	0.55	
		0.7	3	4	4	4			15	0.75	
		1	4	5	4	5			18	0.9	
		1.2	5	5	5	5			20	1	
2	08/11/2017	Blanco	0	0	0	0			0	0	10/11/2017
		0.1	0	2	1	1			4	0.2	
		0.5	3	3	4	2	6.9	7.1	12	0.6	
		0.7	5	4	4	4			17	0.85	
		1	4	5	5	4			18	0.9	
		1.2	5	5	5	5			20	1	
3	13/11/2017	Blanco	0	0	0	0			0	0	15/11/2017
		0.1	1	0	2	1			4	0.2	
		0.5	2	3	4	4	7.5	7.8	13	0.65	
		0.7	5	4	4	4			17	0.85	
		1	3	4	4	5			16	0.8	
		1.2	5	5	5	5			20	1	
4	15/11/2017	Blanco	0	0	0	0			0	0	17/11/2017
		0.1	0	0	0	0			0	0	
		0.5	1	3	2	2	7.3	7.4	8	0.4	
		0.7	5	5	5	4			19	0.95	
		1	5	5	5	5			20	1	
		1.2	5	5	5	5			20	1	
5	20/11/2017	Blanco	0	0	0	0			0	0	22/11/2017
		0.1	0	1	1	0			2	0.1	
		0.5	1	2	3	0	2.9	7.1	6	0.3	
		0.7	5	4	3	4			16	0.8	
		1	5	5	5	5			20	1	
		1.2	5	5	5	5			20	1	
6	22/11/2017	Blanco	0	0	0	0			0	0	24/11/2017
		0.1	1	1	1	1	7.8	7.3	4	0.2	
		0.5	3	3	3	2			11	0.55	
		0.7	5	5	3	4			17	0.85	
		1	4	5	4	4			17	0.85	

		1.2	5	5	5	5			20	1
		Blanco	0	0	0	0			0	0
7	27/11/2017	0.1	1	0	1	1			3	0.15
		0.5	3	2	2	3	6.2	7.6	10	0.5
		0.7	4	3	4	3			14	0.7
		1	5	5	5	4			19	0.95
		1.2	5	5	5	5			20	1
		Blanco	0	0	0	0			0	0
8	04/12/2017	0.1	1	0	2	0			3	0.15
		0.5	2	3	2	1	7.9	7.2	8	0.4
		0.7	5	2	5	5			17	0.85
		1	5	5	5	5			20	1
		1.2	5	5	5	5			20	1
		Blanco	0	0	0	0			0	0
9	06/12/2017	0.1	1	2	2	1			6	0.3
		0.5	2	3	3	1	7.4	7.9	9	0.45
		0.7	5	5	5	4			19	0.95
		1	5	5	5	5			20	1
		1.2	5	5	5	5			20	1
		Blanco	0	0	0	0			0	0
10	11/12/2017	0.1	0	0	2	1			3	0.15
		0.5	1	2	3	2	6.1	7.3	8	0.4
		0.7	5	4	3	4			16	0.8
		1	5	5	5	5			20	1
		1.2	5	5	5	5			20	1

Anexo 8.

Reporte pruebas de sensibilidad de plomo (pb) con *Daphnia pulex*

N° Prueba	Fecha	Concentración ppm	Replicas				Medidas finales		Total muertos	% de mortalidad	Fecha 48h
			1	2	3	4	OD	pH			
Preliminar	Septiembre	Blanco	0	0	0	0			0	0	Octubre
		0.001	0	0	0	0			0	0	
		0.01	0	0	0	0			0	0	
		0.1	1	0	1	1	6-8	7-8	3	0.15	
		1.0	5	5	5	5			20	1	
		5.0	5	5	5	5			20	1	
1	06/11/2017	Blanco	0	0	0	0			0	0	08/11/2017
		0.05	0	0	0	1			1	0.05	
		0.1	1	1	2	0	6.9	7.2	4	0.2	
		0.3	3	3	2	2			10	0.5	
		0.5	4	5	4	4			17	0.85	
		0.7	5	5	5	5			20	1	
2	08/11/2017	Blanco	0	0	0	0			0	0	10/11/2017
		0.05	1	1	0	0			2	0.1	
		0.1	1	1	1	1	7.5	7.1	4	0.2	
		0.3	3	3	2	3			11	0.55	
		0.5	4	4	5	5			18	0.9	
		0.7	5	5	5	5			20	1	
3	13/11/2017	Blanco	0	0	0	0			0	0	15/11/2017
		0.05	0	1	1	1			3	0.15	
		0.1	2	1	3	2	7.2	7.5	8	0.4	
		0.3	3	2	3	4			12	0.6	
		0.5	3	4	4	4			15	0.75	
		0.7	5	5	5	5			20	1	
4	15/11/2017	Blanco	0	0	0	0			0	0	17/11/2017
		0.05	0	1	0	1			2	0.1	
		0.1	1	2	3	1	6.8	7.6	7	0.35	
		0.3	4	3	3	3			13	0.65	
		0.5	4	3	4	4			15	0.75	
		0.7	5	5	5	5			20	1	
5	20/11/2017	Blanco	0	0	0	0			0	0	22/11/2017
		0.05	0	1	0	0			1	0.05	
		0.1	0	1	1	1			3	0.15	
		0.3	1	4	2	3	6.9	7.9	10	0.5	
		0.5	5	4	5	4			18	0.9	
		0.7	5	5	5	5			20	1	
6	22/11/2017	Blanco	0	0	0	0			0	0	24/11/2017
		0.05	0	1	0	0	7.1	7.8	1	0.05	
		0.1	2	1	1	0			4	0.2	
		0.3	3	3	4	2			12	0.6	
		0.5	4	4	5	4			17	0.85	

		0.7	5	5	5	5			20		1
		Blanco	0	0	0	0			0		0
		0.05	0	0	0	0			0		0
7	27/11/2017	0.1	1	0	1	1	7.8	7.2	3		0.15
		0.3	4	3	3	3			13		0.65
		0.5	4	5	5	5			19		0.95
		0.7	5	5	5	5			20		1
		Blanco	0	0	0	0			0		0
		0.05	0	0	1	1			2		0.1
8	04/12/2017	0.1	1	2	2	1	6.3	7.8	6		0.3
		0.3	3	4	4	3			14		0.7
		0.5	4	4	5	5			18		0.9
		0.7	5	5	5	5			20		1
		Blanco	0	0	0	0			0		0
		0.05	1	0	2	0			3		0.15
9	06/12/2017	0.1	2	2	1	2	7.8	7.7	7		0.35
		0.3	4	3	2	4			13		0.65
		0.5	5	5	4	5			19		0.95
		0.7	5	5	5	5			20		1
		Blanco	0	0	0	0			0		0
		0.05	0	1	1	0			2		0.1
10	11/12/2017	0.1	2	3	1	2	6.1	7.3	8		0.4
		0.3	3	4	3	4			14		0.7
		0.5	4	5	5	3			17		0.85
		0.7	5	5	5	5			20		1

Anexo 9

Reporte de pruebas de sensibilidad con muestra ambiental con *Daphnia pulex*

N° Prueba	Fecha	Concentración ppm	Replicas				Medidas finales		Total muertos	% de mortalidad	Fecha 48h
			1	2	3	4	OD	pH			
1	13/12/2017	P.Profundo 100%	5	5	4	5	6.9	7.5	19	0.95	15/12/2017
		P.Profundo 80%	4	5	4	4			17	0.85	
		P.Profundo 60%	3	3	2	4			12	0.6	
		P.Profundo 40%	2	3	2	0			7	0.35	
		P.Profundo 20%	1	0	0	2			3	0.15	
2	18/12/2017	P.Profundo 100%	4	5	5	5	6.2	7.2	19	0.95	20/12/2017
		P.Profundo 80%	4	4	4	4			16	0.8	
		P.Profundo 60%	3	3	4	3			13	0.65	
		P.Profundo 40%	2	1	2	0			5	0.25	
		P.Profundo 20%	0	1	0	0			1	0.05	
3	20/12/2017	P.Profundo 100%	5	5	5	5	6.5	7.8	20	1	22/12/2017
		P.Profundo 80%	5	4	4	3			16	0.8	
		P.Profundo 60%	3	4	2	3			12	0.6	
		P.Profundo 40%	1	1	0	2			4	0.2	
		P.Profundo 20%	0	0	0	0			0	0	
4	03/01/2018	Muelle 100%	5	5	5	5	7.8	7.3	20	1	05/01/2018
		Muelle 80%	5	4	3	5			17	0.85	
		Muelle 60%	4	5	3	4			16	0.8	
		Muelle 40%	3	4	3	3			13	0.65	
		Muelle 20%	1	2	2	1			6	0.3	
5	08/01/2018	Muelle 100%	4	5	5	5	7.1	7.9	19	0.95	10/01/2018
		Muelle 80%	5	4	5	4			18	0.9	
		Muelle 60%	4	5	4	4			17	0.85	
		Muelle 40%	3	3	3	2			11	0.55	
		Muelle 20%	0	0	2	1			3	0.15	
6	10/01/2018	Muelle 100%	5	5	5	5	6.3	7.7	20	1	12/01/2018
		Muelle 80%	5	4	4	5			18	0.9	
		Muelle 60%	4	3	4	4			15	0.75	
		Muelle 40%	3	4	3	2			12	0.6	
		Muelle 20%	2	1	1	0			4	0.2	

Anexo 10

Reporte de pruebas de sensibilidad con el tóxico de referencia Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) con *Daphnia magna*

No Prueba	Fecha	Concentración ppm	Replicas				Medid as finales		Total muertos	% de mortalidad	Fecha 48h
			1	2	3	4	OD	PH			
Preliminar	Septiembre	Blanco	0	0	0	0			0	0	Octubre
		0.001	0	0	0	0			0	0	
		0.01	0	0	0	0	6-8	7-8	0	0	
		0.1	0	1	1	0			2	0.1	
		1.0	5	5	5	5			20	1	
		5.0	5	5	5	5			20	1	
1	15/01/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	17/01/2018
		0.05	1	1	1	0			3	0.15	
		0.1	2	1	1	2	6.2	7.9	6	0.3	
		0.3	5	4	3	4			16	0.8	
		0.5	5	5	4	5			19	0.95	
		1	5	5	5	5			20	1	
2	17/01/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	19/01/2018
		0.05	1	0	1	0			2	0.1	
		0.1	2	1	1	1	6.9	7.1	5	0.25	
		0.3	3	3	4	2			12	0.6	
		0.5	4	4	5	5			18	0.9	
		1	5	5	5	5			20	1	
3	22/01/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	24/01/2018
		0.05	1	0	0	1			2	0.1	
		0.1	1	2	1	2	7.5	7.8	6	0.3	
		0.3	2	1	3	3			9	0.45	
		0.5	2	5	4	4			15	0.75	
		1	5	5	5	5			20	1	
4	24/01/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	26/01/2018
		0.05	0	1	1	0			2	0.1	
		0.1	1	0	1	1	7.3	7.4	3	0.15	
		0.3	4	5	4	3			16	0.8	
		0.5	5	4	5	5			19	0.95	
		1	5	5	5	5			20	1	
5	29/01/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	31/01/2018
		0.05	1	0	0	1			2	0.1	
		0.1	1	1	2	2	2.9	7.1	6	0.3	
		0.3	5	4	4	5			18	0.9	
		0.5	5	4	4	5			18	0.9	
		1	5	5	5	5			20	1	
6	05/02/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	07/02/2018
		0.05	2	1	1	1			5	0.25	
		0.1	3	2	2	2	7.8	7.3	9	0.45	
		0.3	3	4	2	3			12	0.6	
		0.5	5	4	5	4			18	0.9	
		1	5	5	5	5			20	1	

7	07/02/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	09/02/2018
		0.05	0	0	0	1			1	0.05	
		0.1	2	1	2	1	6.2	7.6	6	0.3	
		0.3	3	3	2	3			11	0.55	
		0.5	5	4	3	4			16	0.8	
		1	5	5	5	5			20	1	
8	12/02/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	14/02/2018
		0.05	0	1	0	0			1	0.05	
		0.1	1	2	2	0	7.9	7.2	5	0.25	
		0.3	2	3	3	2			10	0.5	
		0.5	5	4	3	3			15	0.75	
		1	5	5	5	5			20	1	
9	14/02/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	16/02/2018
		0.05	0	1	0	0			1	0.05	
		0.1	1	0	2	2	7.4	7.9	5	0.25	
		0.3	5	5	4	4			18	0.9	
		0.5	4	5	5	5			19	0.95	
		1	5	5	5	5			20	1	
10	19/02/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	21/02/2018
		0.05	0	1	0	1			2	0.1	
		0.1	1	0	2	1	6.1	7.3	4	0.2	
		0.3	3	4	3	3			13	0.65	
		0.5	4	4	4	5			17	0.85	
		1	5	5	5	5			20	1	

Anexo 11

Reporte pruebas de sensibilidad de plomo (pb) con *Daphnia magna*

No Prueba	Fecha	Concentración ppm	Replicas				Medidas finales		Total muertos	% de mortalidad	Fecha 48h
			1	2	3	4	OD	PH			
Preliminar	Septiembre	Blanco	0	0	0	0			0	0	Octubre
		0.001	0	0	0	0			0	0	
		0.01	0	0	1	0	6-8	7-8	1	0.05	
		0.1	1	0	1	1			3	0.15	
		1.0	5	5	5	5			20	1	
		5.0	5	5	5	5			20	1	
1	15/01/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	17/01/2018
		0.05	1	0	0	1			2	0.1	
		0.1	2	2	3	2	7.3	7.6	9	0.45	
		0.3	4	3	4	3			14	0.7	
		0.5	3	4	5	5			17	0.85	
		0.7	5	5	5	5			20	1	
2	17/01/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	19/01/2018
		0.05	0	0	1	0			1	0.05	
		0.1	2	1	2	1	6.7	7.2	6	0.3	
		0.3	4	4	3	3			14	0.7	
		0.5	5	5	4	4			18	0.9	
		0.7	5	5	4	5			19	0.95	
3	22/01/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	24/01/2018
		0.05	1	0	0	1			2	0.1	
		0.1	3	2	2	2	6.2	7.8	9	0.45	
		0.3	4	3	3	2			12	0.6	
		0.5	5	4	4	4			17	0.85	
		0.7	5	5	5	5			20	1	
4	24/01/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	26/01/2018
		0.05	0	1	1	0			2	0.1	
		0.1	1	2	1	1	6.1	7.3	5	0.25	
		0.3	4	2	3	3			12	0.6	
		0.5	5	4	4	3			16	0.8	
		0.7	5	5	5	5			20	1	
5	29/01/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	31/01/2018
		0.05	0	0	1	1			2	0.1	
		0.1	1	2	1	2	7.5	7.6	6	0.3	
		0.3	3	3	3	3			12	0.6	
		0.5	4	5	4	4			17	0.85	
		0.7	5	5	5	5			20	1	
6	05/02/2018	Blanco	0	0	0	0			0	0	07/02/2018
		0.05	0	1	0	0	7.8	7.9	1	0.05	
		0.1	1	1	2	3			7	0.35	
		0.3	2	3	4	4			13	0.65	

		0.5	3	4	5	5			17	0.85	
		0.7	5	5	5	5			20	1	
		Blanco	0	0	0	0			0	0	
		0.05	0	1	0	0			1	0.05	09/02/2018
7	07/02/2018	0.1	2	1	2	1	6.3	7.2	6	0.3	
		0.3	4	3	4	3			14	0.7	
		0.5	5	4	4	3			16	0.8	
		0.7	5	5	5	5			20	1	
		Blanco	0	0	0	0			0	0	
		0.05	0	1	2	0			3	0.15	14/02/2018
8	12/02/2018	0.1	2	3	2	2	6.9	7.8	9	0.45	
		0.3	4	3	4	4			15	0.75	
		0.5	5	4	5	4			18	0.9	
		0.7	5	5	5	5			20	1	
		Blanco	0	0	0	0			0	0	
		0.05	0	0	1	1			2	0.1	16/02/2018
9	14/02/2018	0.1	2	1	1	2	6.2	7.4	6	0.3	
		0.3	4	3	2	3			12	0.6	
		0.5	4	4	4	4			16	0.8	
		0.7	5	5	5	5			20	1	
		Blanco	0	0	0	0			0	0	
		0.05	0	1	1	1			3	0.15	
10	19/02/2018	0.1	3	3	2	1	7.1	7.5	9	0.45	21/02/2018
		0.3	4	3	3	4			14	0.7	
		0.5	3	4	5	4			16	0.8	
		0.7	5	5	5	5			20	1	

Anexo 12

Reporte de pruebas de sensibilidad con muestra ambiental con *Daphnia magna*

No Prueba	Fecha	Concentración Ppm	Replicas				Medidas finales		Total muertos	% de mortalidad	Fecha 48h
			1	2	3	4	OD	pH			
1	21/02/2018	P.Profundo 100%	5	5	5	5			20	1	23/02/2018
		P.Profundo 80%	5	5	5	4			19	0.95	
		P.Profundo 60%	4	3	3	4	6.5	7.2	14	0.7	
		P.Profundo 40%	2	3	2	2			9	0.45	
		P.Profundo 20%	2	1	0	2			5	0.25	
2	26/02/2018	P.Profundo 100%	5	5	5	5			20	1	28/02/2018
		P.Profundo 80%	4	5	4	4			17	0.85	
		P.Profundo 60%	4	3	3	3	6.8	6.6	13	0.65	
		P.Profundo 40%	2	3	2	2			9	0.45	
		P.Profundo 20%	0	1	1	0			2	0.1	
3	05/03/2018	P.Profundo 100%	5	5	5	5			20	1	07/03/2018
		P.Profundo 80%	5	5	5	5	7.1	7.3	20	1	
		P.Profundo 60%	3	3	3	3			12	0.6	
		P.Profundo 40%	3	3	2	2			10	0.5	
		P.Profundo 20%	2	1	1	0			4	0.20	
4	07/03/2018	Muelle 100%	5	5	5	5			20	1	09/03/2018
		Muelle 80%	5	4	5	5	7.6	7.8	19	0.95	
		Muelle 60%	4	4	5	4			17	0.85	
		Muelle 40%	3	3	3	3			12	0.60	
		Muelle 20%	1	2	2	2			7	0.35	
5	12/03/2018	Muelle 100%	5	5	5	5			20	1	14/03/2018
		Muelle 80%	5	5	5	5	7.9	6.4	20	1	
		Muelle 60%	4	4	5	5			18	0.90	
		Muelle 40%	3	3	4	4			14	0.7	
		Muelle 20%	2	2	2	3			9	0.45	
6	14/03/2018	Muelle 100%	5	5	5	5			20	1	16/03/2018
		Muelle 80%	5	4	5	5	6.9	7.2	19	0.6	
		Muelle 60%	4	5	4	4			17	0.85	
		Muelle 40%	4	3	3	4			14	0.70	
		Muelle 20%	1	1	2	2			6	0.30	