



# UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Escuela Politécnica Superior y Facultad de Ciencias Experimentales

Efecto ecotoxicológico del sulfato de cobre en las balsas de riego de los invernaderos de la provincia de Almería

---

*Ingenieros Agrónomos*

*Alumno:*

*Juan Manuel Fernández Morenate*

*Directoras:*

*Dra. María Isabel Sáez Casado*

*Dra. María Dolores Suárez Medina*

Almería, mayo de 2014

## AGRADECIMIENTOS.

---

***A mis tutoras, Dra. María Isabel Sáez Casado y Dra. María Dolores Suárez Medina; su profesionalidad y empatía son muy a tener en cuenta y es algo que nunca voy a olvidar.***

**Especialmente a mis padres, a mi hermano y a mis abuelas, y a todas las personas que me han ayudado.**

---

## ÍNDICE.

---

## ÍNDICE GENERAL.

### I

<b>1. INTERÉS Y OBJETIVOS.</b> .....	11
--------------------------------------	----

### II

<b>2. INTRODUCCIÓN: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.</b> .....	15
<b>2.1. Ecotoxicología. Estudios de toxicidad. Tipos.</b> .....	15
<b>2.2. Conservación de la biodiversidad acuática y gestión de las balsas de riego.</b> .....	18
<b>2.3. Características generales de la especie en estudio.</b> .....	19
<b>2.4. Efecto del cobre sobre la mortalidad: Efecto del Ca y la materia orgánica.</b> .....	21
<b>2.5. Bioacumulación.</b> .....	22
<b>2.6. Efecto del cobre sobre la peroxidación lipídica.</b> .....	24

### III

<b>3. – MATERIAL Y MÉTODOS.</b> .....	28
<b>3.1. Material biológico.</b> .....	28
3.1.1. Especie de estudio. ....	28
3.1.2. Localización de los puntos de muestreo. ....	28
3.1.3. Captura, transporte y condiciones de aclimatación. ....	28
<b>3.2. Instalaciones y condiciones ambientales.</b> .....	29
<b>3.3. Ensayo 1º. Influencia del contenido de Ca y materia orgánica del agua sobre la toxicidad aguda del sulfato de cobre en gambusia.</b> .....	30
3.3.1. Diseño experimental. ....	30
3.3.2. Parámetros evaluados. ....	31
<b>3.4. Ensayo 2º. Peroxidación lipídica en gambusia por exposición a concentraciones subletales de sulfato de cobre.</b> .....	31

---

3.4.1.	Diseño experimental. ....	31
3.4.2.	Parámetros evaluados. ....	32
<b>3.5.</b>	<b>Determinaciones analíticas. ....</b>	<b>33</b>
3.5.1.	Características del agua. ....	33
3.5.2.	Determinación de lípidos totales. ....	33
3.5.3.	Determinación de la peroxidación lipídica. ....	34
3.5.4.	Determinación de cobre en branquias. ....	35
3.5.5.	Determinación de metalotieninas (Mts). ....	36
<b>3.6.</b>	<b>Tratamiento estadístico de los datos. ....</b>	<b>36</b>

## IV

<b>4.</b>	<b>- RESULTADOS. ....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.</b>	<b>Ensayo 1°. Influencia del contenido en Ca y materia orgánica del agua sobre la toxicidad aguda del sulfato de cobre en gambusia. ....</b>	<b>39</b>
4.1.1.	Características del agua. ....	39
4.1.2.	Efectos letales del cobre en gambusia. DL <sub>50</sub> . ....	42
4.1.3.	Concentración del cobre en branquias. ....	45
<b>4.2.</b>	<b>Ensayo 2°. Peroxidación lipídica en gambusia por exposición a concentraciones subletales de sulfato de cobre. ....</b>	<b>47</b>
4.2.1.	Características del agua. ....	47
4.2.2.	Contenido en lípidos y peroxidación lipídica ....	48
4.2.3.	Contenido de cobre en branquias. ....	50
4.2.4.	Contenido en metalotieninas (MTs). ....	50

## V

<b>5.</b>	<b>- DISCUSIÓN. ....</b>	<b>53</b>
<b>5.1.</b>	<b>Ensayo 1°. Influencia del contenido en Ca y materia orgánica del agua sobre la toxicidad aguda del sulfato de cobre en gambusia. ....</b>	<b>53</b>
<b>5.2.</b>	<b>Ensayo 2°. Efecto de la exposición a concentraciones subletales de sulfato de cobre. ....</b>	<b>58</b>

## VI

6. – CONCLUSIONES. ....	62
-------------------------	----

## VII

7. – BIBLIOGRAFÍA. ....	64
-------------------------	----

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Principales características del agua usada en los ensayos de toxicidad aguda con $CuSO_4$ en <i>Gambusia holbrooki</i> con AG (agua grifo), AB (agua de las balsas de riego). AB-MO (agua de las balsas de riego sin MO). ....	39
<b>Tabla 2.</b> Evolución de cobre y calcio y de las principales características fisicoquímicas y concentración de cobre y calcio en el agua usada en los ensayos de toxicidad aguda con $CuSO_4$ en <i>Gambusia holbrooki</i> con AG (agua grifo), AB (agua de las balsas de riego) y AB-MO (agua de las balsas de riego sin MO) ....	41
<b>Tabla 3.</b> Concentración de Cu (mg/L) causante de la mortalidad del 50% de la población ensayada (LC50) en <i>Gambusia</i> después de 24, 48, 72 y 96 h de exposición con su correspondiente límite de confianza del 95% (95% CL).....	44
<b>Tabla 4.</b> Principales características del agua usada en el ensayo de concentraciones subletales de $CuSO_4$ en <i>Gambusia holbrooki</i> .....	47

---

**Tabla 5.** Principales características fisicoquímicas y concentración de cobre y calcio en el agua usada en el ensayo de concentraciones subletales de CuSO<sub>4</sub> en *Gambusia holbrooki*. Valores expresados como media  $\pm$  S.D. (n=3). .....48

**Tabla 6.** Actividad enzimática antioxidante y concentración de malonaldehído (MDA) medidos en el organismo entero de la población inicial (PI) de *Gambusia holbrooki*. Valores expresados como media  $\pm$  S.D. (n=6).....49

**Tabla 7.** Actividad enzimática antioxidante y concentración de malonaldehído (MDA) medidos en el organismo entero de *Gambusia holbrooki* expuesta a diferentes concentraciones de cobre en el agua. Los valores son la media  $\pm$  ES (n=4).....49

## ÍNDICE DE FIGURAS.

**Figura 1.** Ejemplares de la especie *Gambusia holbrooki*: hembra (a) y macho (b). .  
.....20

**Figura 2.** Imágenes de balsas típicas de la zona. ....28

**Figura 3.** Acuarios de recepción y aclimatación. ....29

**Figura 4.** Batería de acuarios experimentales. ....29

**Figura 5.** Diseño experimental de los ensayos de toxicidad aguda.....30

**Figura 6.** Diseño experimental del ensayo de toxicidad crónica/ concentraciones subletales. ....32

**Figura 7.** Evolución del porcentaje de mortalidad en el tiempo en los ensayos de toxicidad aguda con CuSO<sub>4</sub> en *Gambusia holbrooki* con diferentes tipos de aguas: a)



AG (agua grifo),b) AB (agua de las balsas de riego) y c) AB-MO (agua de las balsas de riego sin MO).....43

**Figura 8.** Evolución del % mortalidad en el tiempo: a) a las 24h, b) a las 48), c) a las 72h y d) a las 96h en función de la dosis de Cu ensayada en los diferentes ensayos realizados: agua del grifo (AG), agua de las balsas (AB) y agua de las balsas sin MO (AB-MO).....45

**Figura 9.** Concentración de Cu en branquias en *Gambusia holbrooki* en los ensayos de toxicidad aguda con  $\text{CuSO}_4$  en con diferentes tipos de aguas: a) AG (agua grifo),b) AB (agua de las balsas de riego) y c) AB-MO (agua de las balsas de riego sin MO). Los valores expresan media  $\pm$  S.D. (N=3).....46

**Figura 10.** Concentración de Cu (ss) en branquias en *Gambusia holbrooki* en los ensayos de toxicidad crónica expuestas a 0, 0,1, 0,17 y 0,25 mg Cu/l. Valores expresados como media  $\pm$  S.D. (n=3).....50

**Figura 11.** Concentración de MTs en branquias en *Gambusia holbrooki* en los ensayos de toxicidad crónica expuestas a 0, 0,1, 0,17 y 0,25 mg Cu/l. Valores expresados como media  $\pm$  S.D. (n=3). .....51

## INTERÉS Y OBJETIVOS.

---

## **1. INTERÉS Y OBJETIVOS.**

La contaminación ambiental se puede producir por concentraciones muy elevadas de agentes contaminantes con graves efectos sobre el hombre y la biota producidos por accidentes, derrames, emanaciones, explosiones...en resumen, situaciones de emergencia ambiental. Sin embargo, hay un tipo de contaminación menos evidente, que ocurre en sitios de descargas puntuales de efluentes, domésticos o industriales o la aplicación de agroquímicos al suelo o medios acuáticos. El efecto de este segundo tipo de contaminación es menos alarmante pero no deja de ser grave.

En las regiones del Mediterráneo se ha producido una pérdida y deterioro importante de los humedales debido a la expansión de la agricultura de regadío, que a su vez ha dado lugar a la construcción de miles de balsas de riego. Con frecuencia, las balsas de riego reciben agua de buena calidad y se ha observado que el potencial de albergar la diversidad biológica de estos sistemas pueden ser muy limitado por la utilización de productos tóxicos como herbicidas o pesticidas, que inducen cambios en las características y procesos ecológicos.

El cobre, utilizado durante muchos años en forma de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) en embalses de agua dulce como alguicida y herbicida, puede afectar de forma importante a las poblaciones y los individuos a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y/o genético.

La fracción biodisponible de  $\text{Cu}^{2+}$  en el agua puede verse modificada por factores abióticos como el pH, la concentración de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) y las concentraciones y los puntos de unión a los ligandos orgánicos e inorgánicos. Estos factores tienden a disminuir la toxicidad de Cu, ya sea reduciendo su concentración o compitiendo por superficie activa de sitios de unión en el tejido de las branquias. Debido a esto, características físico-químicas del agua, tales como la alcalinidad, dureza y el pH influyen fuertemente en la especiación de cobre en el agua y, por tanto, en su biodisponibilidad para la absorción por los peces.

La presencia de cobre en agua puede provocar un aumento en la peroxidación lipídica (LP), cadena de reacciones entre los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y las especies reactivas al oxígeno (ROS) que produce peróxidos lipídicos y polímeros hidrocarbonados que son altamente tóxicos para la célula.

La especie objeto de estudio, *Gambusia holbrooki* (pez mosquito), es un pez eurihalino capaz de adaptarse a condiciones ambientales variables, por lo que está ampliamente distribuido y es de fácil manejo, esto hace que haya sido propuesta por muchos autores como un organismo de referencia en estudios de toxicidad. Al mismo tiempo se trata de una especie invasora incluida en la lista de las 100 especies invasoras más dañinas del mundo elaborada por el Grupo Especialista de Especies Invasoras (ISSG) de la UICN (Unión Internacional para la conservación de la Naturaleza). Estas especies, no son solo capaces de provocar la extinción de determinadas especies con las que compiten directamente, sino que también alteran la estructura y funcionamiento de los ecosistemas.

Esta especie ha sido seleccionada para nuestro ensayo debido a su importante presencia en las balsas almerienses, su fácil adaptación al laboratorio y su potencial uso como bioindicador de la contaminación ambiental. Además, su utilización en los ensayos de toxicidad del cobre nos permite profundizar en el estudio simultáneo de dos perturbaciones del medio ambiente: la invasión de especies exóticas y la contaminación por metales.

Atendiendo a los antecedentes descritos en relación con la problemática medioambiental que se deriva del riesgo que supone la presencia de cobre en el agua de las balsas de riego, con el presente trabajo de investigación se pretende alcanzar los siguientes objetivos:

- Determinar el riesgo toxicológico de tipo agudo, dosis letal 50% (DL<sub>50</sub>) que se pueda derivar de la aplicación de cobre en ambientes acuáticos de balsas de riego, mediante la exposición de individuos de gambusia a este metal, evaluando la influencia de las características físico-químicas del agua, contenido en calcio y materia orgánica, sobre su toxicidad.

**“Efecto ecotoxicológico del sulfato de cobre en las balsas de riego de los invernaderos de la provincia de Almería”**

---

- Estudiar los posibles efectos de concentraciones subletales de cobre sobre su acumulación en branquias, el contenido en metalotioneinas (MTs) y el daño lipídico en la gambusia.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

---

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### 2.1. Ecotoxicología. Estudios de toxicidad. Tipos.

La ecotoxicología es una disciplina basada en la toxicología y ecología que se ocupa del estudio de las acciones y los efectos nocivos de agentes tanto químicos como físicos presentes en el ambiente (contaminantes), sobre los constituyentes vivos de los ecosistemas: animales (incluido el hombre), vegetales y microorganismos (Larraín, 1995).

Su objetivo principal es valorar el riesgo ecológico frente a sustancias potencialmente tóxicas en el ambiente para proporcionar información suficiente que permita elaborar estrategias de gestión con el objetivo final de proteger los ecosistemas.

En los estudios ecotoxicológicos se deben tener en cuenta varios factores como i) las características intrínsecas de la sustancia (actividad biológica o características físico-químicas, distribución en el ambiente), ii) características de la emisión (carga, patrones de descarga) y iii) las características de las propiedades ambientales (ecosistemas, corrientes etc.) (Encina y Díaz, 2001).

La evaluación del riesgo ecológico estudia la probabilidad de que los efectos adversos puedan ocurrir o que puedan estar ocurriendo como resultado de la exposición a uno o más agentes estresantes, como producto de las múltiples actividades realizadas por el hombre, una evaluación puede involucrar agentes químicos, físicos y biológicos estresantes (EPA, 1998).

En la evaluación del riesgo que supone un agente/contaminante químico sobre las comunidades acuáticas se debe considerar tanto la evaluación de la exposición como el efecto (Gaete *et al.*, 2005).

A) Caracterización de la exposición: corresponde a la evaluación de la potencial interacción de ocurrencia o contacto de los agentes estresantes con una o más entidades ecológicas. La evaluación de la exposición a través de la determinación de las concentraciones ambientales de los agentes químicos, por sí solo, no asegura la protección de la vida acuática, ya que no permite predecir sus potenciales efectos tóxicos, cuando ocurren efectos sinérgicos o aditivos, entre los elementos (Vighi *et al.*, 2003).

B) Caracterización de los efectos: establece la relación entre el agente contaminante y los efectos adversos producidos sobre una entidad biológica (EPA, 1998). La toxicidad de contaminantes químicos puede estar condicionada por otras variables como pH, materia orgánica, dureza, y otros parámetros que determinan su biodisponibilidad y su potencial de toxicidad (Bakers *et al.*, 2003).

En los últimos años, los estudios ecotoxicológicos han aumentado considerablemente con el fin de medir el efecto ecológico de la contaminación agrícola en los ecosistemas acuáticos (Van Dam *et al.*, 1998). Existen varias estrategias para la elaboración del diagnóstico de calidad de un ambiente determinado, tales como:

- a) Determinación de parámetros físico-químicos y biológicos.
- b) Detección de bioindicadores de contaminación.
- c) Realización de bioensayos de laboratorio y campo.

Las dos primeras estrategias generan información sobre el estado a nivel de sus condiciones abióticas y/o bióticas en un periodo determinado (Lopretto y Tell, 1995).

Los bioensayos son herramientas biológicas usadas para evaluar el efecto de agentes de carácter químico en las que se utilizan organismos que pueden representar los diferentes niveles tróficos de un ecosistema acuático (Sponza, 2003). Así podemos medir la respuesta de las entidades ecológicas frente a la exposición de un contaminante mediante organismos de una determinada especie (Castillo, 2004). Estas mediciones experimentales permiten establecer una relación causal entre las concentraciones ambientales y los efectos sobre individuos y poblaciones, permitiendo extrapolar estos resultados al nivel de comunidad y ecosistema (Encina y Díaz, 2001). Se usan para diferenciar los efectos de contaminantes de aquellos inducidos por otras perturbaciones. (USGS, 2000).

Estas pruebas de toxicidad permiten obtener respuestas del daño a la biota y ecosistemas de manera rápida, aun cuando miles de sustancias químicas potencialmente tóxicas puedan o no ser detectadas por análisis rutinarios ya



que la gran diversidad, extensión y complejidad de los mismos hacen casi imposible su caracterización completa, así mismo, ayudan a monitorear el ambiente incluso cuando es difícil predecir el efecto conjunto que se produce con la interacción de las sustancias o factores como el pH, la dureza y el carbono orgánico disuelto, entre otros (Castañeda, 1999). Proporcionan evidencia directa del efecto acumulativo de contaminantes en la supervivencia, crecimiento, conducta o la reproducción de organismos (Cepeda, 2000).

Las pruebas de toxicidad o bioensayos pueden realizarse *in vitro* con células y tejidos de una variedad de organismos, o en vivo con organismos completos que van desde el tamaño de una bacteria a vertebrados. Las respuestas a medir pueden variar desde indicadores bioquímicos de exposición a los contaminantes o daño genético, a la muerte o pérdida de movilidad de organismos en una prueba de corto plazo.

Según la Agencia de Protección Ambiental de USA, USEPA, (1999), las características que deben reunir los bioensayos o test con especies individuales en ambientes acuáticos son:

- Integrar aditividad e interacciones acumulativas de químicos.
- Proveer una medida directa de biodisponibilidad química.
- Medir respuestas a tóxicos para los cuales no hay estándares de calidad de agua específicos.
- Permitir alerta temprana y fiable del deterioro de ecosistemas acuáticos.
- Deben estar altamente estandarizados con garantía de calidad específica y requerimientos de control para proveer resultados fiables, replicables y comparables.
- Deben ser interpretados de forma rápida.

Los bioensayos pueden ser de dos tipos:

a) **Toxicidad aguda:** estos test determinan la concentración de tóxico en el ambiente acuático que produce un efecto adverso en un grupo de organismos de prueba durante un tiempo de exposición relativamente breve (24, 48, o 96 horas). La respuesta es la letalidad. Sus respuestas pueden expresarse como

concentraciones medias, habitualmente  $DL_{50}$ , que es la dosis de tóxico que causa la muerte del 50% de organismos ensayados (Encina y Díaz 2001). El uso de los datos de toxicidad aguda es esencial para la evaluación ecotoxicológica de productos químicos y se han recomendado para mejorar la base de datos de toxicidad en curso para los diferentes grupos tróficos en los ecosistemas de agua dulce y agua marina (Lenwood *et al.*, 1998).

b) **Toxicidad crónica:** son definidos como tests a largo plazo en los que se miden efectos subletales (EPA, 1998). La duración puede llegar a ser de alrededor de la décima parte de la vida media de la especie. Se suele medir como variable respuesta cambios en el metabolismo, crecimiento o alteraciones de la capacidad reproductora (Metcalf y Eddy, 1995).

## **2.2. Conservación de la biodiversidad acuática y gestión de las balsas de riego.**

Conforme la población humana y la economía crecen, aumenta la demanda mundial de agua dulce en paralelo con el deterioro de los ecosistemas acuáticos (Pimentel *et al.*, 2004; Moss, 2008) asociado a una pérdida proporcional de la biodiversidad (Dudgeon *et al.*, 2005). En diversos estudios se ha observado que los ecosistemas acuáticos continentales están experimentando disminuciones en la biodiversidad en mayor proporción respecto a los ecosistemas terrestres (Ricciardi y Rasmussen, 1999; Sala *et al.*, 2000; Evaluación de los Ecosistemas del Milenio, 2005; Xenopoulos *et al.*, 2005).

La sobreexplotación de aguas superficiales y subterráneas, la contaminación del agua, alteraciones y regulación de caudales, la destrucción o degradación de los hábitats y la invasión por especies exóticas, son citadas con frecuencia como las principales amenazas para la biodiversidad de los ecosistemas acuáticos continentales (Allan y Flecker, 1993; Rahel, 2002; Dudgeon *et al.*, 2005). En las regiones del Mediterráneo, como en otras áreas del mundo, la pérdida y deterioro de los humedales se ha producido principalmente debido a

la expansión de la agricultura de regadío, que a su vez ha propiciado la construcción de miles de balsas de riego (Casas *et al.*, 2010). Con frecuencia, las balsas de riego reciben agua de buena calidad (Bonachela *et al.*, 2007) y sería lógico pensar que podrían generar hábitats de gran valor para la conservación de la biodiversidad. Sin embargo, en estudios recientes llevados a cabo en balsas de riego usadas en agricultura de regadío se observó que el potencial de albergar biodiversidad de estos medios artificiales puede ser severamente limitado por su régimen hidrológico, el tipo de materiales con que se construyen y por la aplicación de tratamientos agresivos con biocidas (Abellán *et al.*, 2006; Sebastián-González *et al.*, 2009; Casas *et al.*, 2010).

El cobre ha sido utilizado durante muchos años como una herramienta química en embalses de agua dulce y en la acuicultura, se puede aplicar en el agua de diferentes formas, aunque la más económica y usual es en forma de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>). Su uso principal es como alguicida y herbicida aplicado en balsas (Carbonell y Tarazona 1993), y ha sido y es ampliamente usado para controlar la proliferación de algas y el crecimiento no deseado de organismos acuáticos en acuicultura (Thornton y Rast, 1997).

El problema que acarrea esta práctica, es que debido a la alta solubilidad que presenta el sulfato de cobre, se genera toxicidad en los organismos acuáticos ya que los iones de cobre interrumpen la osmorregulación de las branquias y causando daños mecánicos y fisiológicos (Massaut, 1999).

### **2.3. Características generales de la especie en estudio.**

El desarrollo de resistencia a metales está muy bien descrita en algas (Ivorra *et al.*, 2002) y plantas (Hu&Wang, 2001), pero existen pocos ensayos que demuestren la adaptación del metal en las poblaciones naturales de organismos acuáticos (Reinecke *et al.*, 1999).

Por otra parte, la mayoría de los datos sobre resistencia a los metales en los organismos acuáticos están basados en la investigación en especies

invertebradas, mientras que la resistencia de los taxones de vertebrados está muy poco documentada (Reznick&Ghalambor, 2001).

Las especies invasoras son, después de la destrucción directa del hábitat, la principal causa de la pérdida de biodiversidad en el planeta (Primarck *et al.*, 2002). Estas especies, no son solo capaces de provocar la extinción de determinadas especies nativas con las que compiten directamente, sino que también alteran la estructura y funcionamiento de los ecosistemas causando efectos nocivos socioeconómicos/sanitarios en muchos casos (Primarck *et al.*, 2002; Orueta, 2007).

La gambusia, *Gambusia holbrooki* (Girard, 1859), es una especie de pez epicontinental incluida en la lista de las 100 especies invasoras más dañinas del mundo elaborada por el Grupo Especialista de Especies Invasoras (ISSG) de la UICN (Unión Internacional para la conservación de la Naturaleza) (Love *et al.*, 2004). Ha sido incluida por el ISSG entre las 20 especies exóticas de mayor impacto en España (GEIB, 2006).



a



b

*Gambusia holbrooki* (Girard, 1859)

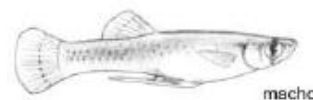
Familia: Poeciliidae

Orden: Cyprinodontiformes

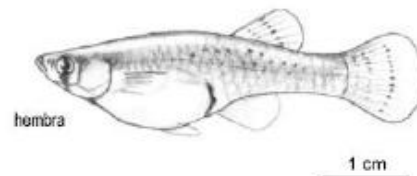
Clase: Actinopterygios

Nombre común: Gambusia, gambusino

Sinonimias: *Gambusia affinis holbrooki*



macho



hembra

1 cm

**Figura 1.- Ejemplares de la especie *Gambusia holbrooki*: hembra (a) y macho (b).**

Esta especie ha sido seleccionada para nuestro ensayo, al igual que en otros estudios, como organismo control, debido a su importante presencia, su fácil adaptación al laboratorio y su potencial uso como bioindicador de la contaminación ambiental (Annabi *et al.*, 2008). Es un organismo capaz de adaptarse fácilmente a diversas condiciones medioambientales. Se distribuye ampliamente en sistemas de agua dulce y estuarios de las regiones templadas. No sólo es abundante, sino también es fácil de capturar y su mantenimiento en condiciones controladas de laboratorio es relativamente fácil. Esta especie posee una alta fecundidad y ha sido considerado como un representante de los consumidores secundarios en ecosistemas acuáticos. Estas características describen a la especie como un adecuado modelo en ecotoxicología.

### **2.4. Efecto del cobre sobre la mortalidad: Influencia del Ca y la materia orgánica.**

Los metales pesados son uno de los mayores y más extendidos grupos de contaminantes en los ambientes por su naturaleza persistente y su lenta eliminación del medio (Fargavosa, 1998).

El cobre, es un elemento traza esencial para la vida de los organismos. Forma parte de la estructura de más de 30 enzimas y otras moléculas (Harris, 1991). Sin embargo, dependiendo de la especie, determinadas concentraciones de cobre pueden ser tóxicas para los organismos produciendo considerables alteraciones histopatológicas y fisiológicas (Sarasquete *et al.*, 1997; Ortiz-Delgado *et al.*, 1999).

Numerosas actividades antropogénicas pueden dar lugar a concentraciones elevadas de cobre en aguas dulces. El sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) es uno de los componentes más frecuentemente usado como alguicida y herbicida en lagos y balsas y para el control de crecimiento de organismos acuáticos indeseados en tanques de acuicultura. La exposición a altas concentraciones de cobre puede afectar a las poblaciones y los individuos a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y/o genético (Troncoso *et al.*, 2000).

La toxicidad del Cu se atribuye sobre todo a la forma  $\text{Cu}^{2+}$  y, en menor medida por ser menos frecuente al  $\text{CuOH}^+$ . El  $\text{Cu}^{2+}$  rápidamente forma complejos con las sustancias inorgánicas y orgánicas y puede ser adsorbido a las partículas de materia orgánica. Como resultado, los iones de  $\text{Cu}^{2+}$  raramente están en forma libre en agua, excepto en aguas blandas y ácidas (Robinson y Avenant-Oldewage, 1997).

La fracción biodisponible de  $\text{Cu}^{2+}$  en el agua puede verse modificada por factores abióticos como el pH, la concentración de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) y las concentraciones y los puntos de unión a los ligandos orgánicos e inorgánicos (Wang, 1987). Estos factores tienden a disminuir la toxicidad de  $\text{Cu}^{2+}$ , ya sea reduciendo su concentración o compitiendo por superficie activa de sitios de unión en el tejido de las branquias (Pagenkopf, 1983; Campbell y Stokes, 1985).

Características físico-químicas del agua, tales como la alcalinidad, dureza y el pH influyen fuertemente en la especiación de cobre en el agua y, por tanto, su biodisponibilidad para la absorción por los peces (Tao *et al.*, 1999). Blust *et al.* (1991) expuso al crustáceo eurihalino *Artemia franciscana* a un aumento en la concentración de cobre y observó que la absorción de este metal aumentó linealmente en función de su concentración en la solución y esto fue más evidente en aguas alcalinas y neutras más que en medio ácido. Según estos autores, el efecto de los iones de hidrógeno en la absorción del metal se expresa como la ionización del sistema de transporte de metal, haciendo hincapié en que las alteraciones de pH afectan el proceso de absorción de cobre.

## **2. 5. Bioacumulación.**

Los metales conforman un numeroso conjunto de elementos que, en líneas generales, están caracterizados por no ser biodegradables, tener una elevada persistencia en el medio y ser susceptibles a ser incorporados y acumulados por el organismo (Allen-Gil *et al.*, 1997). Algunos metales pesados pueden

permanecer en solución, una proporción de ellos se acumulan en los sedimentos y otros en las aguas de los ríos, estuarios, o mares (Lloyd, 1992).

Los efectos biológicos de los metales observados en organismos expuestos incluyen alteraciones en parámetros hemáticos, metabólicos, inmunitarios, desarrollo embrionario, e incluso en un incremento de la incidencia de neoplasias (Zelikoff *et al.*, 1995). Los metales pesados disueltos en las aguas producen generalmente asfixia en los peces, debido a los precipitados o coagulados de mucoproteínas sobre el epitelio branquial, esto constituye un bloqueo del intercambio de gases, la excreción de productos de desecho y la osmorregulación (Jones, 1973).

Estos elementos metálicos pueden acumularse en los peces a través de la columna de agua, a través del sedimento o de la dieta, adicionalmente pueden pasar a través de la cadena alimenticia y eventualmente impactar en la salud humana. (Alquezar *et al.*, 2005).

Resultados obtenidos con peces de la especie capitán de la sabana (*Eremophilus mutisii*) (Rodríguez *et al.*, 2007) sugieren que hay una relación significativa entre la composición de los microelementos en el agua y la acumulación de metales pesados en los tejidos. Este estudio mostró graves alteraciones en la morfología y función branquial de los individuos, debido a su gran superficie de contacto con el agua, por lo que estas son la primera barrera para los metales pesados disueltos.

Las causas del daño branquial se deben a un incremento del espesor endotelial de las branquias que conduce a la disminución de la capacidad de difusión relativa del epitelio branquial, lo cual conduce a hipoxia, como se ha visto en la trucha arco iris (van Heerden *et al.*, 2004). Se ha observado que puede haber una reversión del daño branquial, así como también un daño permanente por el incremento del número de células necróticas y apoptóticas debido a la hipertrofia tisular (van Heerden *et al.*, 2004).

Los peces bioacumulan metales, lo que permite su uso como bioindicadores de concentración de metales en lugares donde las muestras de agua están por debajo de los límites de detección con las técnicas de absorción atómica (Ramelow *et al.*, 1989). A partir de los años 80, el uso de biomarcadores en

programas de monitorización de contaminación ambiental ha tenido un papel muy relevante. Entre los organismos biomonitores se ha usado la especie *Gambusia affinis* (Nunes *et al.*, 2008) y dentro de los biomarcadores destacan métodos bioquímicos (actividades enzimáticas, lisosomas, peroxidación lipídica, proteínas del estrés, metaloproteínas, citocromo P450,.....), (Rodríguez *et al.*, 2005).

## **2.6. Efecto del cobre sobre la peroxidación lipídica.**

El Cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) al ser un metal es muy tóxico para algunos organismos acuáticos (Madoni y Romeo, 2006) genera un excesivo número de radicales libres que conduce a la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS), que reaccionan con componentes celulares resultantes de la peroxidación de los lípidos (Livingstone, 2001; Florencia *et al.*, 2002) llevando en última instancia a la muerte celular (Elia *et al.*, 2003).

La peroxidación lipídica (LP) es una reacción en cadena entre los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y las especies reactivas del oxígeno (ROS) y produce tanto peróxidos lípidos y como polímeros de hidrocarburos que son altamente tóxicos para la célula. Es considerado como un importante fenómeno por el cual los oxirradicales pueden causar daño en los tejidos que conducen a insuficiencia celular y alteraciones en las propiedades fisicoquímicas de las membranas celulares, que a su vez alteran las funciones vitales (Rikans y Hornbrook, 1997). Otro factor que afecta el potencial de daño oxidativo es el nivel de las moléculas blanco como los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (Di Giulio *et al.*, 1995). Por lo tanto, la incidencia de la peroxidación de lípidos puede depender el nivel de ROS generados por el cobre y la composición de ácidos grasos en los organismos.

La peroxidación lipídica es producida por el ataque de una molécula lo suficientemente reactiva como para extraer un H de un ácido graso poliinsaturado quedando éste con un electrón desapareado. El proceso de



peroxidación lipídica puede dividirse en tres fases: iniciación, propagación y terminación.

En la fase de iniciación, se forma un radical lipídico ( $R^+$ ) por acción de los radicales libres, que en presencia de oxígeno genera un radical peróxido ( $ROO^-$ ). Este radical es muy susceptible de extraer hidrógenos a otros lípidos generándose, como consecuencia de su acción, un hidroperóxido ( $ROOH$ ) y, de nuevo, un radical lipídico que iniciará otra vez la secuencia de reacciones en la fase de propagación. La fase de terminación tendría lugar cuando los radicales interaccionan entre sí o cuando un antioxidante cede el H a un radical peroxilo (Cowey, 1986).

En condiciones de iluminación de ácidos grasos poliinsaturados, pueden producirse moléculas de  $O_2$  que pueden originar un desplazamiento de dobles enlaces generando  $ROOH$ . El  $O_3$  también puede dar lugar a especies reactivas que estimulen la peroxidación.

La peroxidación lipídica puede darse en los lípidos que se encuentran en la membrana celular, hecho que puede alterar la cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica, además de conducir a una inestabilidad de la membrana y consecuente daño y muerte celular. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son un sustrato afín para la peroxidación lipídica y su susceptibilidad aumenta a medida que se eleva el número de enlaces insaturados (Ochoa y González, 2008).

Una de las técnicas más comúnmente utilizadas en peces para medir los niveles de peroxidación lipídica es el empleo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que cuantifica los niveles de producción de malondialdehído (MDA).

Otro factor que afecta al potencial daño oxidativo es el contenido en ácidos grasos de cadena larga, PUFA (Di Giulio *et al.*, 1995). El cobre, por su actividad oxidativa, puede afectar a la composición en ácidos grasos de los organismos. Maazouzi *et al.*, (2008) mostraron cambios significativos en la composición de ácidos grasos en el anfípodo gammarido *Dikerogammarus villosus* expuesto a la contaminación crónica con cobre. Los individuos de aguas menos contaminadas presentaron un mayor contenido en ácidos grasos totales. Los

**“Efecto ecotoxicológico del sulfato de cobre en las balsas de riego de los invernaderos de la provincia de Almería”**

---

procedentes de las aguas más contaminadas mostraron un mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados, sobre todo los de larga cadena, explicado por los autores como una estrategia de detoxificación que evita la peroxidación de los PUFA.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

---

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 3.1. Material biológico.

##### 3.1.1. Especie de estudio.

Para el presente estudio se han utilizado gambusias (*Gambusia holbrooki*) tomadas de las balsas de riego de los invernaderos de la provincia de Almería, intentando mantener una proporción 1:1 entre machos y hembras.

##### 3.1.2. Localización de los puntos de muestreo.

Los peces se capturaron en balsas de riego ubicadas en el Paraje “Rambla Lechuga”, en el parque periurbano “El boticario”, en el término municipal de Almería.

La existencia de abundantes plantas hidrófilas y algas en las balsas donde se tomaron los peces indica que, al menos en el último año, no se habían tratado con sulfato de cobre.



**Figura 2.** Imágenes de balsas típicas de la zona.

##### 3.1.3. Captura, transporte y condiciones de aclimatación.

Para la captura de los peces se utilizaron dos métodos:

- Pesca con una manga de manejo cuya red tenía una luz de malla de 250 micras.
- Utilización de trampas artesanales tipo Minnow (1.5 L de capacidad) cebadas con comida enlatada para peces.

Las gambusias capturadas se transportaron en neveras con agua de las balsas hasta el laboratorio. Durante la fase de aclimatación se mantuvieron en acuarios de vidrio con capacidad útil de 40 L y se alimentaron *ad libitum* con un preparado comercial (Tetra Dr. Wu Gammarus) una vez al día. Se empleó un sistema estático, sin recambio de agua, pero con filtración y aireación constante. Los ejemplares se distribuyeron aleatoriamente en los acuarios, sometiéndose a un periodo mínimo de aclimatación de 8 días.

### **3.2. Instalaciones y condiciones ambientales.**

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de Ecología de la Universidad de Almería.

Las gambusias se distribuyeron en acuarios de polietileno de 5 L, con aireación constante, sin exposición directa a la luz, manteniendo un rango de temperaturas entre 17 y 23 ° C. En cada uno de los recipientes se introdujeron 20 peces, procurando mantener una proporción 1:1 entre machos y hembras.

Antes de introducir los peces se añadió sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), de la marca comercial Panreac, (purísimo). Se preparó una solución madre concentrada de la que se añadieron 100 ml al resto del agua (4.900 L), mezclándola y dejándola reposar para lograr uniformidad y homogeneidad en la solución.



**Figura 3. Acuarios de recepción y aclimatación.**



**Figura 4. Batería de acuarios experimentales.**

### 3.3. Ensayo 1°. Influeagua sobre la toxicidad aguda del sulfato de cobre en gambusia

#### 3.3.1. Diseño experimental.

Se hicieron 3 ensayos de toxicidad aguda con tres tipos diferentes de agua:

- **Agua de la red de agua potable de la ciudad (AG):** mantenida durante 3 días para eliminar el cloro añadido en la potabilización.
- **Agua procedente de las balsas de riego (AB):** Obtenida de la Comunidad de Regantes San Jerónimo, en el término municipal de Níjar.
- **Agua de las balsas en la que se eliminó la materia orgánica (AB-MO):** Mediante la adición de hipoclorito sódico (2%) para garantizar la oxidación de la materia orgánica 48 h antes del ensayo.

Los experimentos duraron 96 horas, realizando controles cada 24 horas. El ensayo fue de tipo estático, durante el cual no hubo recambio de agua y los peces no fueron alimentados.

Se ensayaron 4 concentraciones de sulfato de cobre: 0,25; 0,75; 1,5 y 4 mg Cu/L y un grupo control (C) libre de cobre. Estas concentraciones se obtuvieron consultando las dosis de uso general por los agricultores de la zona en los tratamientos de balsas de riego.

Los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las concentraciones ensayadas.

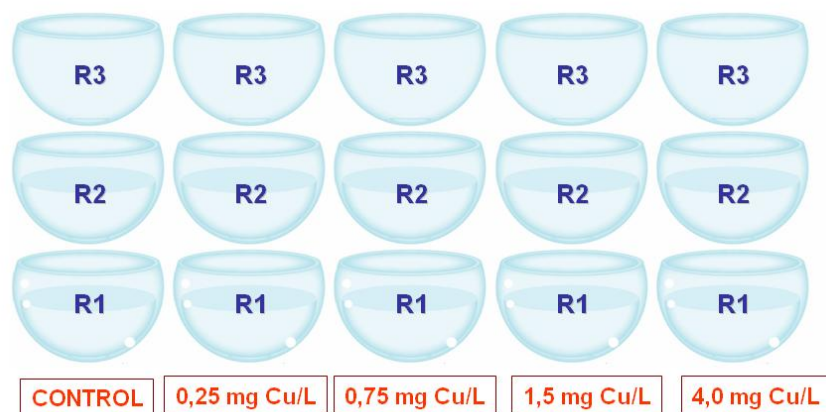


Figura 5. Diseño experimental de los ensayos de toxicidad aguda.

### **3.3.2. Parámetros evaluados.**

#### **-Características del agua.**

La calidad del agua se controló con dos sondas multiparamétricas:

- Medida de pH y conductividad eléctrica (C.E.)(WTW, pH /Cond 340i).

- Medida de O<sub>2</sub> disuelto (mg/l), %saturación de O<sub>2</sub>, temperatura (°C) (HACH SET).

Además se instalaron dos sondas de medida de temperatura en continuo en 2 de los acuarios (Hobo-PendantCoupler).

Tanto al inicio como al final de cada uno de los ensayos se tomaron muestras de agua de cada recipiente para su posterior análisis químico. Se analizaron nutrientes solubles en agua: nitratos, nitritos, fosfatos y amonio, y concentración de calcio y cobre.

#### **-Evolución de la mortalidad.**

Diariamente se registraron el número de individuos muertos (% de mortalidad), su sexo y tamaño. Con el % de mortalidad se determinó la dosis letal del 50% de los individuos a las 96 horas (DL<sub>50</sub>-96h), por medio del método de regresión Probit con límites de confianza al 95 % y verificada la regresión lineal mediante el test de Chi-cuadrado utilizando programa SPSS v.1,5.

#### **-Concentración de cobre en branquias.**

Por el método explicado en el Apartado de determinaciones analíticas.

## **3.4. Ensayo 2º. Efecto de la exposición crónica de la gambusia a concentraciones subletales de sulfato de cobre sobre la peroxidación lipídica.**

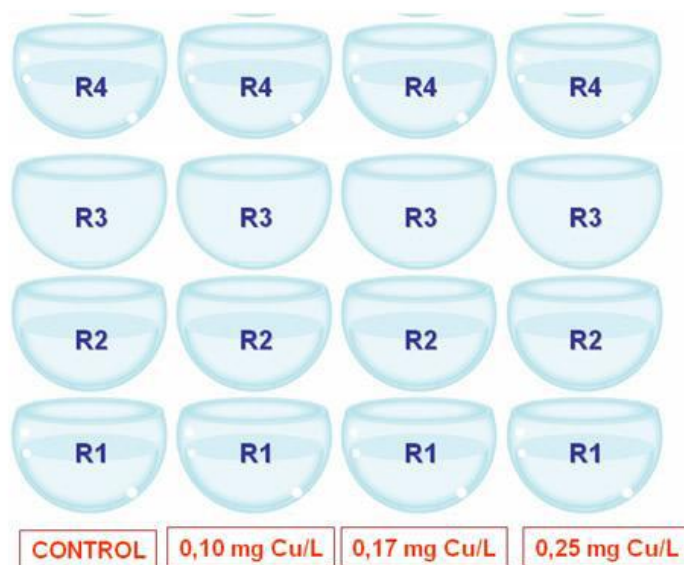
### **3.4.1. Diseño experimental.**

El ensayo de concentraciones subletales tuvo una duración de 20 días. Se utilizó agua de la red previamente dechlorada. Se empleó un sistema dinámico

con recambio cada 5 días del 100% del agua, manteniendo la concentración de Cu iniciales en cada acuario, y aireación constante.

Se analizaron 3 dosis subletales de sulfato de cobre: 0,10; 0,17 y 0,25 mg Cu/L y un control libre de cobre. Estas concentraciones fueron seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda.

Los experimentos se realizaron por cuadruplicado para cada una de las concentraciones ensayadas.



**Figura 6. Diseño experimental del ensayo de toxicidad crónica/ concentraciones subletales.**

Los ejemplares se distribuyeron en los acuarios a razón de 12 peces por recipiente, estableciendo igual número de machos y hembras (distribución en función del sexo) que de individuos de tamaño grande y pequeño (distribución en función del tamaño).

Los peces se alimentaron diariamente, con un preparado comercial (Tetra Dr. Wu Gammarus) y una dosis del 2% del peso medio del animal (en torno a 1,2 gr alimento por acuario).

### 3. 4. 2. Parámetros evaluados.

#### - Características del agua.

Igual que en el experimento de toxicidad aguda.



**- Toma de muestras.**

Se tomaron muestras de peces (n=4) al inicio y final del periodo experimental manteniendo siempre la misma proporción entre machos y hembras. Las muestras iniciales se tomaron a fin de realizar una caracterización de la población en el punto inicial.

Los peces se anestesiaron de acuerdo con los requisitos establecidos por la directiva 86/609/EEC con una sobredosis de aceite de clavo (isoeugenol). Se congelaron en N<sub>2</sub> líquido, y se almacenaron a -80°C para posteriormente medir los siguientes parámetros:

- **Concentración de cobre en branquias**
- **Concentración de Metalotieninas (MTs).**
- **Determinación de la peroxidación lipídica.**

### **3.5. Determinaciones analíticas.**

#### **3.5.1. Características del agua.**

**- Tratamiento de las muestras de agua.**

Las muestras se filtraron utilizando un filtro de fibra de vidrio milipore (0.45micras) y se almacenaron en congelador a -20°C hasta su posterior análisis.

**- Análisis de nutrientes en agua.**

Se analizaron los nutrientes solubles en agua: nitratos, nitritos, fosfatos y amonio de los 2 bioensayos realizados. La cuantificación de los mismos se realizó por diferentes métodos.

-Nitratos: se usó el método del Salicilato sódico, en el cual los nitratos en presencia de salicilato sódico dan el p-nitrosalicilato sódico de color amarillo susceptible de una determinación colorimétrica.

-Nitritos: por el método de la sulfanilamida, en el que la diazotación de la sulfanilamida en medio ácido y su copulación con la N-(1-naftil)-etilen-diamina da un complejo coloreado púrpura susceptible de determinación colorimétrica.

-Fosfatos: por el método del molibdato amónico, en el que el fosfato en solución diluida reacciona con molibdato amónico en medio ácido para dar ácido fosfomolibdico que, a su vez se reduce, con ácido ascórbico a azul de molibdeno, cuya intensidad de color es medible por espectrofotometría. El tartrato de antimonio y potasio se añade para acomplejar a otros posibles aniones presentes, tales como  $\text{SiO}_2$  que puedan interferir en la reacción, así como para fijar el color azul.

-Amonio: se usó el método del salicilato, en el cual el amonio libre reacciona con el hipoclorito para formar monocloramina. La monocloramina reacciona con el salicilato para formar 5-aminosalicilato. La oxidación del 5-aminosalicilato se lleva a cabo en presencia de un catalizador, nitroferriicianida, que tiene como resultado la formación de indosalicilato, un compuesto de color azul. El color azul se enmascara por el color amarillo (del exceso de nitroferrocianida) originando una solución de color verde. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de amonio en la muestra.

#### **- Análisis de cobre.**

El análisis del cobre se realizó por espectroscopia de absorción atómica con atomización electrotérmica. El equipo utilizado fue un Espectrofotómetro de Absorción Atómica (AAS) 1100 B equipado con un horno de grafito (HGA) 700, ambos de Perkin Elmer. Las temperaturas de calcinación y atomización optimizadas fueron de 1000 °C y 2300 °C, respectivamente. La longitud de onda de medida para el Cobre fue de 324,5 nm. La cuantificación de las muestras se llevó a cabo utilizando una curva de calibrado con patrones preparados en agua desionizada con un 0.2 % en  $\text{HNO}_3$  con concentraciones comprendidas entre 5 y 30  $\mu\text{g/L}$ .

#### **3.5.2. Determinación de lípidos totales.**

Para la determinación de lípidos totales se utilizó el método descrito por Kochert (1978).

Se pesaron aproximadamente 100mg de biomasa seca liofilizada a la que se le añadieron 3 mL de cloroformo: metanol 2:1 (v/v). Posteriormente se añadieron

3 mL de HCl 0,1 N y 0,3 mL de MgCl<sub>2</sub> 0,5 % para que se produjera la precipitación de las proteínas.

Después de agitar y centrifugar a 2000 g durante 5 min separar el extracto lipídico con una pipeta pasteur. Sobre el residuo obtenido, se realizó una segunda extracción, reuniendo la fase orgánica con la obtenida anteriormente en un tubo previamente tarado.

El tubo se llevó a un bloque térmico se mantuvo durante 2 días a 45 °C para conseguir la evaporación del disolvente orgánico. Pasado ese tiempo, se volvió a pesar el tubo, obteniendo por diferencia los lípidos totales contenidos en la biomasa seca.

### **3.5.3. Determinación de la peroxidación lipídica.**

La técnica se basa en la formación de malondialdehído (MDA) tras la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados por la acción de los radicales OH. El MDA en presencia de ácido tiobarbitúrico (TBA), da a lugar un reactivo rojizo que absorbe luz a 535 nm (Buege y Aust, 1978).

Los peces completos se homogeneizaron en tampón Tris-HCl 100mM, tritón X-100 0.1%, pH 7.8 con un homogenizador eléctrico (PT-2100, Politron) en una proporción 1 g de tejido en 4 ml de tampón.

Los homogeneizados fueron centrifugados a 16.000 rpm (30.000g) durante 30 minutos a 4 °C en centrifuga refrigerada (Selecta). Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante, que fue dividido en alícuotas y congelado a -80 °C hasta su posterior análisis.

El extracto se hizo reaccionar con ácido tricloroacético (15% p/v) y TBA (0,35%), 0,1 ml de muestra (extractos y patrones) con 0,5 ml de reactivo. Tras la agitación vigorosa, se incubó durante 15 minutos a 100°C. A continuación se dejó enfriar y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Se tomó 0,2 ml del sobrenadante se leyó a  $\lambda=535$  nm en un microplacas (BIO-TEC mod. PowerWave XS) frente al blanco reactivo. El resultado se interpoló en una curva de calibración de malondialdehído (MDA).

#### **3. 5. 4. Determinación de cobre en branquias.**

Las branquias se extrajeron con pinzas ayudados de una lupa. Se determinó la humedad en estufa a 70°C durante 48 h y se procedió:

- Incineración en horno mufla a 450 °C hasta obtención de cenizas blancas (Aproximadamente 2 días).
- Hidrólisis ácida con HCl (al 35 %, en dilución 1:1, con agua destilada) y HNO<sub>3</sub> (al 65%, en dilución 1:1, con agua destilada). Las soluciones se filtraron y aforaron a 100 mL y se analizaron con espectrofotometría de absorción atómica. El equipo utilizado fue el mismo que para la determinación del cobre en agua. Se prepararon 2 blancos con la misma solución filtrada pero sin cenizas.

#### **3. 5. 5. Determinación de Metalotieninas (MTs).**

El contenido en MTs fue determinado en el cuerpo de los peces según la técnica de Viarengo et al., (1997). El tejido liofilizado (0,5 g) fue homogenizado en 1,5 ml de tampón 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) con 0,5 M de suscrosa, 0,006 mM leupeptina, 0,5 mM PMSF y 0,01% de β-mercaptoethanol. A continuación se centrifugó durante 20 minutos a 30000 g a 4°C. A 1 ml sobrenadante se añadieron 1,05 ml de metanol y 80 µl de cloroformo, y la muestra se centrifugó a 6000 g durante 10 min a 4°C. Al sobrenadante se añadió 1 mg de ARN, 40 µl de HCl al 37% y 3 volúmenes de etanol. Después de 1 hora a -20°C la muestra se volvió a centrifugar. El precipitado con las MT se lavó con 2 ml de 87% etanol, 1% cloroformo y 12% tampón de homogenización, centrifugado y secado bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. El precipitado se resuspendió en 150 µl de NaCl 0,25 M y los metales se separaron de las MT con 150 µl de HCl1N y 4 mM EDTA.

Para determinar el contenido de MTs se añadieron 4,2 ml de NaCl 2 M con 0,43 mM 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic ajustado a pH 8 con 0,2 M Na-fosfato. Después de centrifugar a 3000 g durante 5 min, se midió la absorbancia del sobrenadante a 412 nM y la concentración de MTs se estimó con glutathion (GSH) como estándar de referencia.

### **3.6. Tratamiento estadístico.**

Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía, seguido de una comparación de medias (test de Tukey). Salvo indicación en contra, se ha considerado un nivel de significación del 95% para determinar diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ). Los resultados expresados como porcentaje fueron normalizados previamente, utilizando la transformación del arco de seno de su raíz cuadrada, de acuerdo con Sokal&Rohlf (1981). Toda la estadística se realizó utilizando un programa informático específico (Statgraphics Plus 4.0, StatisticalGraphics Corp., Rockville, Maryland, USA).

La  $DL_{50}$  se calculó a través del método de regresión Probit con límites de confianza al 95 % y verificada la regresión lineal mediante el test de Chi-cuadrado utilizando programa SPSS v.1,5.

## RESULTADOS.

---

## 4. RESULTADOS.

### 4.1. Ensayo 1º. Influencia del contenido en Ca y materia orgánica del agua sobre la toxicidad aguda del sulfato de cobre en gambusia.

#### 4.1.1. Características del agua.

Los parámetros de calidad del agua contenida en los acuarios en los diferentes ensayos se muestran en la tabla1, se expresa el valor medio de los datos tomados durante las 96 horas que duró el experimento. Con respecto al tipo de agua utilizado, el pH fue más alcalino en el agua de las balsas sin materia orgánica (AB-MO), respecto al agua de la balsa de riego sin tratamiento previo (AB) y a la del grifo (AG) ( $p=0,0001$ ). La conductividad también se ha visto alterada, siendo superior en AB-MO seguida de AB y AG.

**Tabla1. Principales características del agua usada en los ensayos de toxicidad aguda con  $CuSO_4$  en *Gambusia holbrooki* con AG (agua grifo), AB (agua de las balsas de riego). AB-MO (agua de las balsas de riego sin MO).**

Parámetro	AG	AB	AB-MO
Temperatura (°C)	22,26 <sup>a</sup> ± 0,63 (23,48-20,81 )	22,03 <sup>a</sup> ± 0,69 (24,26 -20,81 )	23,08 <sup>b</sup> ± 0,55 ( 23,97-22,14)
pH	7,55 <sup>a</sup> ± 0,10 (8,38 -7,13)	7,92 <sup>a</sup> ± 0,25 (8,39 -7,19)	8,48 <sup>b</sup> ± 0,18 (8,89 -7,89)
Conductividad (mS/cm <sup>2</sup> )	781 <sup>a</sup> ± 6,85 (799 -751)	1374 <sup>b</sup> ± 10,10 (1417 -1345)	1712,99 <sup>c</sup> ± 9,29 (1767 -1655)
Oxígeno (mg / L)	8,25 <sup>b</sup> ± 0,30 (8,83 -6,38)	8,46 <sup>c</sup> ± 0,33 (8,91 -7,41)	7,98 <sup>a</sup> ± 0,41 (8,67 -6,61)

<sup>a,b,</sup>muestran diferencias significativas entre tratamientos. ( $p<0,05$ ).

En la tabla 2 se muestran los valores del contenido de nutrientes disueltos en las diferentes aguas (nitratos, nitritos, fosfatos, amonio). Considerando el tiempo 0 ( $T_0$ ) se observó un mayor contenido en nitratos y ligeramente superior

en nitritos en AG respecto a AB y AB-MO, sin embargo, el contenido de fosfatos y amonio fue mayor en AB respecto a las demás aguas. En AG predominan los nitratos y fosfatos y en AB y AB.MO los fosfatos y amonio.

En el ensayo con agua del grifo (AG) al inicio del experimento ( $T_0$ ) no se observó influencia de la dosis de cobre sobre estos parámetros salvo para contenido en amonio que fue superior en todos los acuarios tratados con cobre frente al control. A las 96 h tampoco se observaron diferencias entre los tratamientos de cobre, tan sólo se detectó un aumento del contenido en amonio al aumentar la concentración de cobre en el agua.

El agua de las balsas (AB) en el  $T_0$  no se observaron diferencias en el contenido de fosfatos y nitritos entre tratamientos, pero si se detectó una disminución de nitratos y aumento de amonio al aumentar la dosis de cobre. A las  $T_{96}$  observó un aumento de nitritos y del amonio en los tratamientos con menos dosis de cobre, mientras que en los de mayor dosis disminuyó.



“Efecto ecotoxicológico del sulfato de cobre en las balsas de riego de los invernaderos de la provincia de Almería”

**Tabla2. Evolución de características fisicoquímicas al inicio y final del experimento en el agua usada en los ensayos de toxicidad aguda con CuSO<sub>4</sub> en *Gambusia holbrooki* con AG (agua grifo), AB (agua de las balsas de riego) y AB-MO (agua de las balsas de riego sin MO).**

		AG		AB		AB-MO	
		T <sub>0</sub>	T <sub>96</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>96</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>96</sub>
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)	C	0,0455	0,0616	0,0616	0,0778	0,0212	0,0446
	0,25 mg Cu/l	0,0455	0,0778	0,0616	0,0616	0,0112	0,1183
	0,75 mg Cu/l	0,0616	0,0778	0,0778	0,0778	0,0279	0,0313
	1,5 mg Cu/l	0,0455	0,0939	0,0765	0,0616	0,0246	0,0078
	4 mg Cu/l	0,0455	0,0778	0,0616	0,0455	0,0346	0,0045
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	C	0,5375	0,3023	0,0285	0,0200	0,0000	0,0083
	0,25 mg Cu/l	0,5290	0,4990	0,0499	0,0200	0,0000	0,0041
	0,75 mg Cu/l	0,4520	0,4990	0,0627	0,0242	0,0000	0,0041
	1,5 mg Cu/l	0,5461	0,5503	0,0157	0,0114	0,0000	0,0041
	4 mg Cu/l	0,4947	0,5161	0,0157	0,0071	0,0000	0,0000
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	C	0,0107	0,0135	0,0078	0,0164	0,0000	0,0028
	0,25 mg Cu/l	0,0107	0,0192	0,0078	0,0164	0,0000	0,0051
	0,75 mg Cu/l	0,0078	0,0164	0,0078	0,0221	0,0000	0,0034
	1,5 mg Cu/l	0,0078	0,0107	0,0078	0,0135	0,0000	0,0028
	4 mg Cu/l	0,0078	0,0107	0,0078	0,0107	0,0000	0,0011
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	C	0,0087	0,0203	0,1475	0,6156	0,0158	0,7314
	0,25 mg Cu/l	0,0578	0,0203	0,0174	0,0289	0,0129	0,7171
	0,75 mg Cu/l	0,0304	0,0174	0,0723	0,0116	0,0143	0,6453
	1,5 mg Cu/l	0,0448	0,3237	0,1619	0,0087	0,0229	0,5981
	4 mg Cu/l	0,0521	0,2255	0,1879	0,0116	0,0172	0,0459

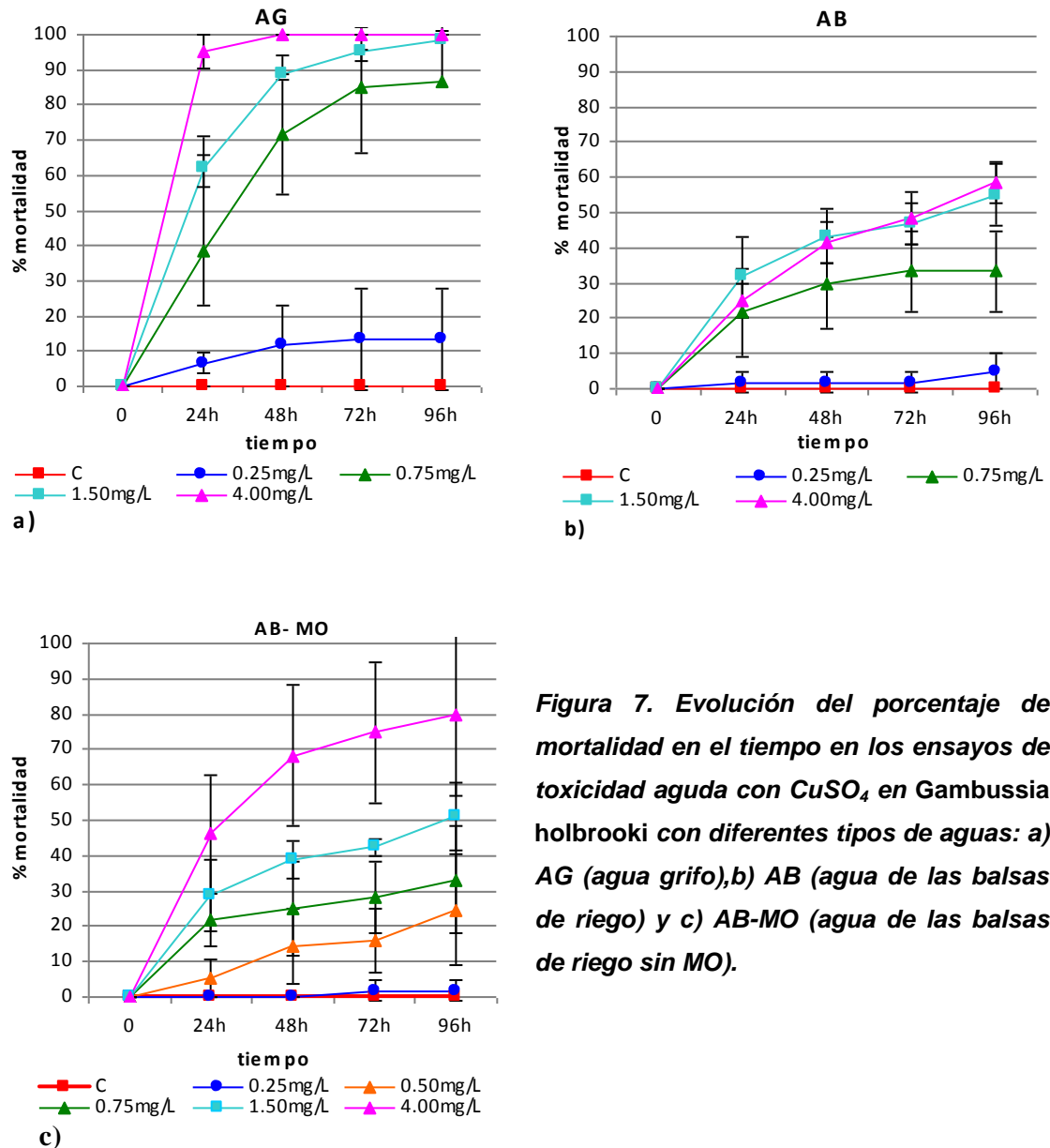
El agua de las balsas de riego en las que se eliminó la materia orgánica (AB-MO), mostró valores muy similares para todos los nutrientes en los distintos tratamientos al principio del experimento ( $T_0$ ). El tratamiento con hipoclorito sódico, además de eliminar la materia orgánica, también parece ejercer un efecto de reducción de las concentraciones de nitratos y nitritos. A  $T_{96}$  se observó una disminución significativa del contenido en fosfatos mediante el uso de las dosis más altas de cobre. Los nitratos, nitritos y amonio aumentaron con respecto al punto inicial, aunque este aumento fue inferior para las dosis más altas de cobre.

#### **4.1.2. Efectos letales del cobre en *Gambusia*. $DL_{50}$ .**

La mortalidad de los peces durante su exposición a dosis letales de cobre se evaluó cada 24 h durante un periodo total de 96 h, en los tres tipos de aguas descritas anteriormente (AG, AB y AB-MO). La evolución de los porcentajes de mortalidad obtenidos para estos tres tipos de aguas se representa en la Figura 7.

En el agua del grifo (Figura 7.a), la mortalidad fue del 100% a las 96 h con dosis de 1,5 y 4,0 mg Cu/L. En el caso del tratamiento de mayor dosis (4,0 mg Cu/L), este efecto apareció a partir de las 48 h. Para los tratamientos de 0,75 y 0,25 mg Cu/L se observaron mortalidades del 88% y 12% a las 96h, respectivamente. Durante la fase experimental, no se presentó mortalidad en los individuos del grupo control.

**“Efecto ecotoxicológico del sulfato de cobre en las balsas de riego de los invernaderos de la provincia de Almería”**



**Figura 7. Evolución del porcentaje de mortalidad en el tiempo en los ensayos de toxicidad aguda con  $CuSO_4$  en *Gambusia holbrooki* con diferentes tipos de aguas: a) AG (agua grifo), b) AB (agua de las balsas de riego) y c) AB-MO (agua de las balsas de riego sin MO).**

En el ensayo realizado con agua de las balsas de riego (Figura 7.b), no se observó mortalidad del 100% de los peces para ninguna de las dosis ensayadas. Durante la fase experimental, la mortalidad a las 96 h fue del 5%, 33%, 55% y 58% para las dosis de 0,25, 0,75, 1,5 y 4 mg/L, respectivamente. Tampoco hubo mortalidad en los individuos del grupo control.

Cuando se realizó la experiencia con agua de la balsa sin M.O., por la adicción de hipoclorito sódico, como se puede ver en la Figura 7.c, la mortalidad a las 96 h fue de 1,7%, 33%, 50% y 80% para las dosis de 0,25, 0,75, 1,5 y 4 mg/L,

respectivamente. Si comparamos los datos con los del experimento con agua de la balsa con M.O., observamos que para la mayor dosis (4mg/L) al eliminar la materia orgánica el % mortalidad aumenta en un 22% siendo para las demás dosis el porcentaje similar. Tampoco se presentó mortalidad en los individuos del grupo control.

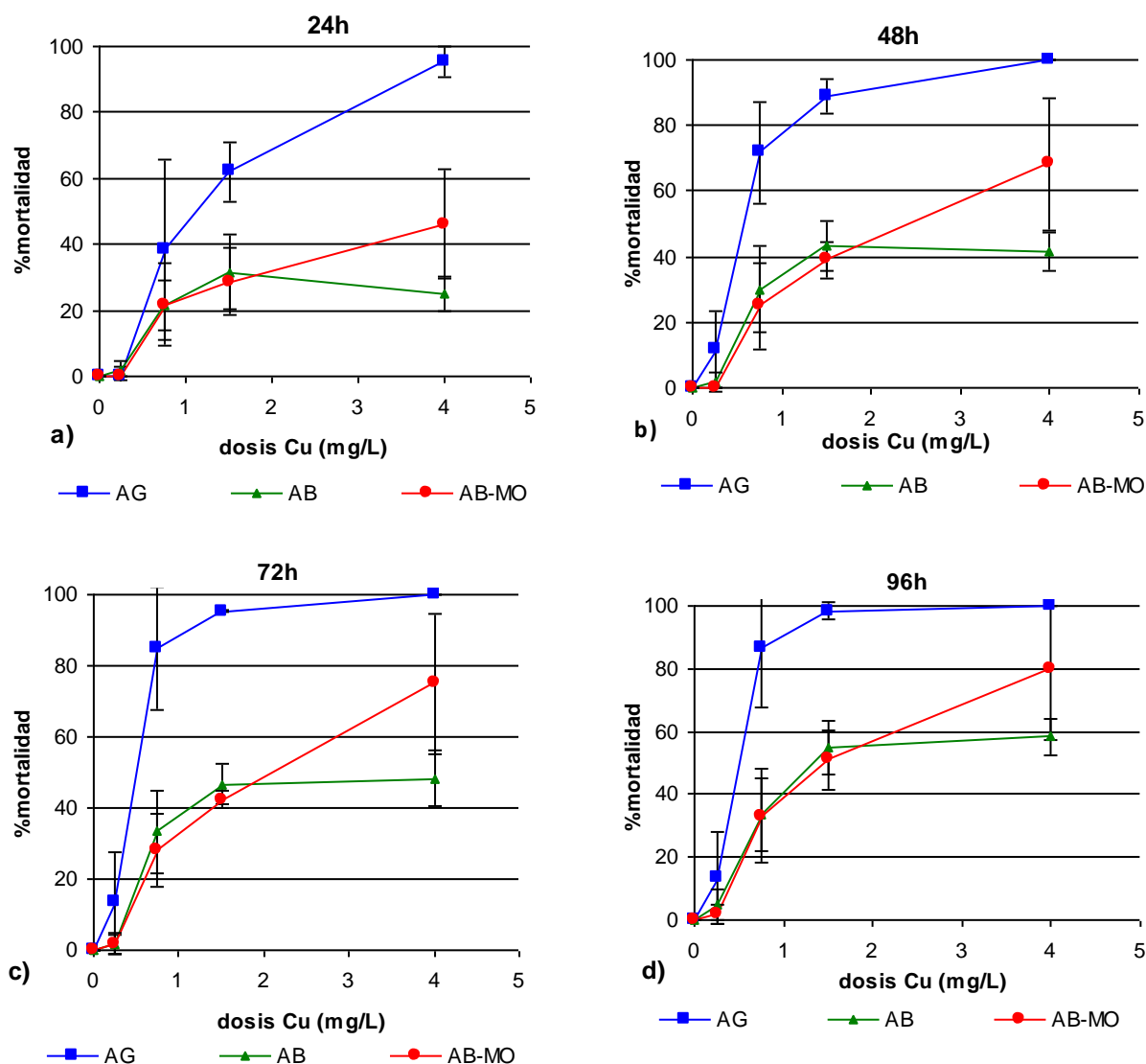
A partir de los datos de mortalidad en cada tratamiento y a los diferentes tiempos se ha calculado la dosis letal 50 (concentración letal asociada a la mortalidad del 50% de la población estudiada) mediante el método Probit. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3. Concentración de Cu (mg/L) causante de la mortalidad del 50% de la población ensayada (DL50) en gambusia después de 24, 48, 72 y 96 h de exposición con su correspondiente límite de confianza del 95% (95% CL).**

	Periodo de exposición (h)			
	24	48	72	96
<b>DL<sub>50</sub> AG</b>	1,317 (1,361-1,206)	0,911 (0,932-0,898)	0,817 (0,817-0,816)	0,783 (0,787-0,775)
<b>DL<sub>50</sub> AB</b>	5,408 (5,683-2,748)	2,587 (5,092-1,894)	2,285 (3,942-1,751)	1,897 (2,776-1,553)
<b>DL<sub>50</sub> AB-MO</b>	2,435 (4,165-1,854)	1,780 (2,333-1,517)	1,662 (2,094-1,446)	1,505 (1,814-1,341)

La DL<sub>50</sub>-96h de Cu asociado a CuSO<sub>4</sub> fue superior en el agua de las balsas de riego (AB) con un valor de 1,90 mg/L, respecto al agua de las balsas sin MO (1,51 mg/L) y al agua de grifo, que presentó el menor valor de DL<sub>50</sub>-96h, de 0,78 mg/L.

El porcentaje de mortalidad a las 96 horas en función de la dosis de Cu ensayada en las diferentes aguas ensayadas se representa en la Figura 8. El aumento del número de peces muertos en AG y en AB-MO fue proporcional al aumento de la dosis de cobre aplicada. Cuando se usó AB, este aumento proporcional se observó solamente hasta la dosis de 1,5mg/L, a partir de la cual se mantuvo el nº de muertos a pesar del aumento de dosis aplicada.



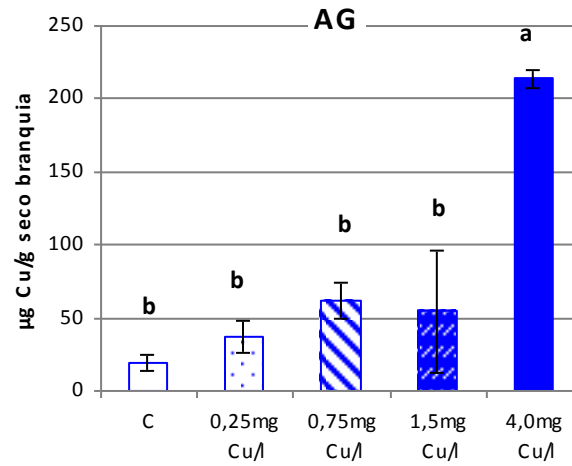
**Figura 8. Evolución del % mortalidad en el tiempo: a) a las 24h, b) a las 48h, c) a las 72h y d) a las 96h en función de la dosis de Cu ensayada en los diferentes ensayos realizados: agua del grifo (AG), agua de las balsas (AB) y agua de las balsas sin MO (AB-MO).**

#### 4.1.3. Concentración de cobre en branquias.

La concentración de cobre en las branquias de gambusias mantenidas en agua del grifo se representa en la Figura 9.

En el bioensayo de toxicidad aguda con agua del grifo, se observó un aumento de la concentración de cobre en las branquias a medida que aumentó la concentración de cobre aplicada en el agua. El tratamiento con mayor dosis, 4 mg Cu/L mostró una concentración superior a 200  $\mu\text{g Cu/g}$  de peso seco de

branquia, muy superior estadísticamente a los demás tratamientos de 0,25; 0,75 y 1,5 mg/L en donde la concentración fue de 40 a 60  $\mu\text{g Cu/g}$  de peso seco de branquia, ( $p=0,000$ ).



<sup>a</sup> y <sup>b</sup> muestran diferencias significativas entre tratamientos. ( $p < 0,05$ ).

**Figura 9. Concentración de Cu en branquias en Gambusia holbrooki en los ensayos de toxicidad aguda con  $\text{CuSO}_4$  en con diferentes tipos de aguas: a) AG (agua grifo), b) AB (agua de las balsas de riego) y c) AB-MO (agua de las balsas de riego sin MO). Los valores expresan media  $\pm$  S.D. (N=3).**

## 4.2. Ensayo 2º. Efecto de concentraciones subletales de cobre sobre su acumulación en branquias, el contenido en MTs y el daño lipídico en la gambusia.

### 4.2.1. Características del agua.

Los parámetros de calidad del agua contenida en los acuarios se muestran en la tabla 4, se ha expresado el valor medio de los datos tomados en continuo durante los 5 días en los que se mantuvo en agua sin renovación.

**Tabla 4. Principales características del agua usada en el ensayo de concentraciones subletales de  $\text{CuSO}_4$  en *Gambusia holbrooki*.**

Parámetro		
Temperatura (°C)	22,57 ± 0,68	(24,93-20,09)
Ph	7,73 ± 0,14	(8,21- 7,36)
Conductividad (mS/cm)	827 ± 6,85	(855 -795)
Oxígeno (mg / L)	8,25 ± 0,14	(8,62 -7,79)

En la tabla 5 aparecen los valores del contenido de nutrientes disueltos en el agua (nitratos, nitritos, fosfatos, amonio). No se observaron diferencias entre tratamientos, aunque sí se observó un aumento considerable de los nitritos, amonio y fosfatos entre el punto final ( $T_f$ ) respecto al inicial ( $T_0$ ) para todas las dosis ensayadas. Los nitratos se mantuvieron en concentraciones similares.

**Tabla5. Principales características fisicoquímicas en el agua usada en el ensayo de concentraciones subletales de  $\text{CuSO}_4$  en *Gambusia Holbrooki*. Valores expresados como media  $\pm$  S.D. (n=3).**

		T <sub>0</sub>		T <sub>f</sub>	
	C	0,4122	$\pm$ 0,09	0,341	$\pm$ 0,09
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	0,10 mg Cu/L	0,4854	$\pm$ 0,09	0,452	$\pm$ 0,15
	0,17 mg Cu/L	0,4729	$\pm$ 0,03	0,5043	$\pm$ 0,05
	0,25 mg Cu/L	0,5231	$\pm$ 0,05	0,4792	$\pm$ 0,03
	C	0,0036	$\pm$ 0,00	0,0671	$\pm$ 0,03
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	0,10 mg Cu/L	0,0019	$\pm$ 0,00	0,0436	$\pm$ 0,02
	0,17 mg Cu/L	0,0016	$\pm$ 0,00	0,0255	$\pm$ 0,00
	0,25 mg Cu/L	0,0045	$\pm$ 0,00	0,0282	$\pm$ 0,01
	C	0,0045	$\pm$ 0,00	0,5039	$\pm$ 0,04
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)	0,10 mg Cu/L	0,0095	$\pm$ 0,01	0,5005	$\pm$ 0,12
	0,17 mg Cu/L	0,053	$\pm$ 0,06	0,4177	$\pm$ 0,09
	0,25 mg Cu/L	0,0062	$\pm$ 0,00	0,5332	$\pm$ 0,07
	C	0,0244	$\pm$ 0,01	0,7744	$\pm$ 0,10
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	0,10 mg Cu/L	0,0430	$\pm$ 0,00	0,9358	$\pm$ 0,20
	0,17 mg Cu/L	0,1735	$\pm$ 0,02	0,8784	$\pm$ 0,21
	0,25 mg Cu/L	0,0344	$\pm$ 0,00	1,0219	$\pm$ 0,30

#### 4.2.2. Contenido en lípidos y peroxidación lipídica.

El contenido en lípidos totales y la peroxidación lipídica (expresada como contenido en MDA) en la población inicial de gambusias se expresa en la Tabla 6 y las de la población expuesta a concentraciones subletales de cobre en la Tabla 7. Tanto el contenido en lípidos totales como la peroxidación lipídica fueron mayores en las hembras en la población inicial de gambusias.



**“Efecto ecotoxicológico del sulfato de cobre en las balsas de riego de los invernaderos de la provincia de Almería”**

**Tabla 6. Concentración de malonaldehído (MDA) medidos en el organismo entero de la población inicial (PI) de *Gambusia holbrooki*. Valores expresados como media  $\pm$  S.D. (n=6).**

	MACHOS	HEMBRAS
Lípidos totales	10,1 $\pm$ 1,8	19,8* $\pm$ 1,0
MDA	6,1 $\pm$ 2,4	7,9* $\pm$ 1,6

Los símbolos \* muestran diferencias significativas entre sexos ( $p < 0,05$ );

En la población final no se han observado diferencias en el contenido en lípidos entre machos y hembras; sin embargo, la peroxidación lipídica si ha mostrado valores superiores en hembras que en machos. Las mayores concentraciones de cobre (0,25mg Cu/L) han provocado un aumento significativo en los dos parámetros tanto en machos como en hembras.

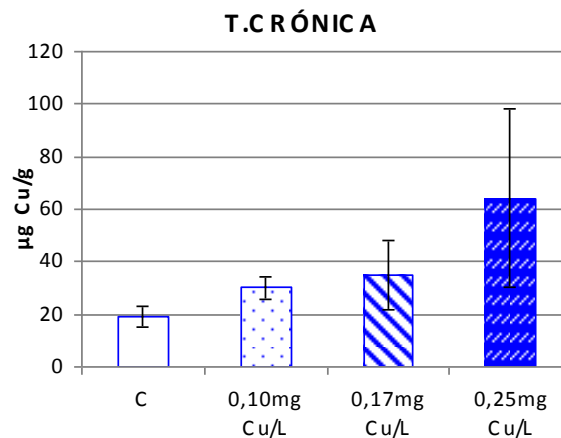
**Tabla 7. Contenido en lípidos (% ss) y concentración de Malonaldehído (nmol MDA/gtej. ss) medidos en el organismo entero de *Gambusia holbrooki* expuesta a diferentes concentraciones de cobre en el agua. Los valores son la media  $\pm$  ES (n=4).**

	CONTROL		0,10mg Cu/L		0,17mg Cu/L		0,25mg Cu/L	
	M	H	M	H	M	H	M	H
Lípidos totales	11,1 <sup>a</sup> $\pm$ 2,3	9,7 <sup>A</sup> $\pm$ 1,2	9,4 <sup>a</sup> $\pm$ 0,2	10,6 <sup>A</sup> $\pm$ 2,1	11,2 <sup>a</sup> $\pm$ 1,3	10,2 <sup>A</sup> $\pm$ 0,8	13,2 <sup>b</sup> $\pm$ 2,6	13,2 <sup>B</sup> $\pm$ 2,2
MDA	10,7 <sup>b</sup> $\pm$ 1,1	13,1 <sup>B*</sup> $\pm$ 0,8	5,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,4	8,3 <sup>A*</sup> $\pm$ 1,8	5,7 <sup>a</sup> $\pm$ 1,4	8,5 <sup>A*</sup> $\pm$ 1,8	7,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,8	8,9 <sup>A</sup> $\pm$ 0,8

Los símbolos \* muestran diferencias significativas entre sexos; <sup>a,b</sup>, muestran diferencias significativas entre diferentes concentraciones de Cu en machos; <sup>A,B</sup>, muestran diferencias significativas entre diferentes concentraciones de Cu en hembras. ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3. Contenido de cobre en branquias.

Los valores de las concentraciones de cobre en las branquias (sustancia seca) de las gambusias en el ensayo con concentraciones subletales (Figura 10) oscilaron entre 19 y 44  $\mu\text{g/g}$ , observándose un aumento del contenido de cobre proporcional a la concentración de este metal en el agua, aunque no fue estadísticamente significativo.

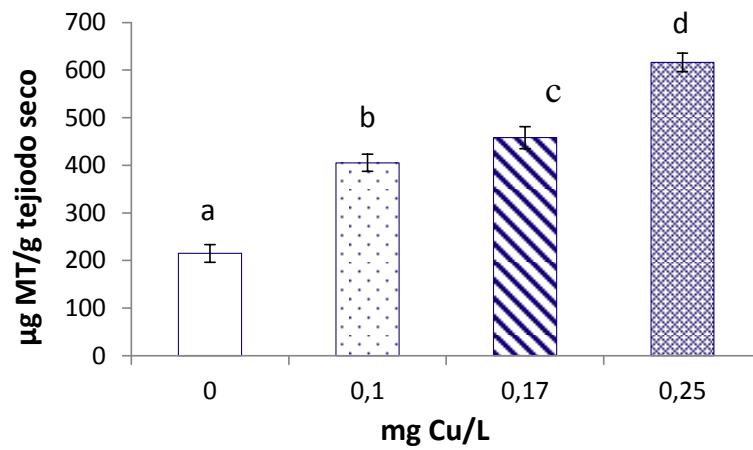


**Figura 10. Concentración de Cu (ss) en branquias en *Gambusia holbrooki* en los ensayos de toxicidad crónica expuestas a 0, 0,1, 0,17 y 0,25 mg Cu/l. Valores expresados como  $\text{media} \pm \text{S.D.}$  ( $n=3$ ).**

De la misma forma que en el ensayo nº 1 de toxicidad aguda (Figura 9), el aumento de acumulación de este metal pesado es proporcional a la dosis de cobre aplicada en el agua. Las cantidades de cobre acumuladas fueron menores en este ensayo ya que las dosis de exposición fueron menores al tratarse de concentraciones subletales.

#### 4.2.4. Contenido en metalotieninas (MTs).

El contenido en MTs al final del experimento se muestra en la Figura 11. Se ha observado un aumento significativo desde 215,0 en los peces controles hasta 616,2 mg MT/g tejido seco en peces expuestos a las mayores concentraciones de cobre, las diferencias entre tratamientos fueron significativas.



**Figura 11.** Concentración de MTs en branquias en *Gambusia holbrooki* en los ensayos de toxicidad crónica expuestas a 0, 0,1, 0,17 y 0,25 mg Cu/l. Valores expresados como media  $\pm$  S.D. (n=3).

DISCUSIÓN.

---

## 5. DISCUSIÓN.

### 5.1. Ensayo 1º. Influencia del contenido en Ca y materia orgánica del agua sobre la toxicidad aguda del sulfato de cobre en gambusia.

El objetivo del presente estudio fue la determinación del riesgo toxicológico de tipo agudo derivado de la aplicación de cobre en las balsas de riego, ambientes con gran potencial de generar hábitats de elevado valor para la conservación de la biodiversidad, que podría compensar la pérdida de humedales naturales.

Para ello se utilizaron individuos de gambusia y se expusieron a diferentes concentraciones letales de este metal. Para evaluar la posible influencia de las características físico-químicas del agua sobre la toxicidad, además del agua obtenida de las balsas de riego (AB) se ensayaron las mismas concentraciones de cobre en otros dos tipos de aguas: la procedente del grifo (AG), de menor dureza y conductividad y el agua de las balsas tratada con hipoclorito sódico y posteriormente declorada (AB-MO), en la que se había eliminado la materia orgánica.

La evolución de la mortalidad a lo largo de las 96 h del experimento mostró que la toxicidad del cobre fue muy superior en AG (a las 24 h ya se había producido un 90% de mortalidad para la dosis más alta) que en AB-MO (próxima al 50% a las 24 h) mientras que en AB fue muy inferior (30% a las 24 h). Estas mortalidades fueron proporcionales a las dosis empleadas y se mantuvieron en todas las medidas realizadas (24, 48, 72 y 96 h).

En los ensayos AG y AB-MO se observó una relación dosis-respuesta entre la concentración de cobre y la mortalidad, encontrada por otros muchos autores como Marr *et al.* (1998) en experimentos realizados con trucha arco iris (*Onchorrhynchus mykiss*). Sin embargo, en el ensayo AB esta relación dosis-respuesta, se observó sólo hasta el tratamiento de 1,5 mg/L, a partir del cual no aumentó la mortalidad. El motivo de este hecho puede ser una menor disponibilidad del cobre añadido a esta agua, y, por lo tanto, menor toxicidad. El  $\text{Cu}^{2+}$  aplicado en una dosis superior, compite con la M.O. y  $\text{Ca}^{2+}$  presentes

en esta agua en mayor proporción, y precipita reduciendo, por tanto, su toxicidad.

La DL<sub>50</sub>-96h del cobre obtenida en nuestro experimento para *Gambusia holbrooki* ha variado entre de 0,78 mg Cu/L (AG) y 1,89 mg Cu/L (AB). Estas dosis son superiores a las determinadas para otras muchas especies, lo que podría ser debido a una mayor resistencia de esta especie al metal estudiado o a una menor toxicidad del Cu en estos tipos de aguas.

La DL<sub>50</sub> establecida por Alam y Maughan (1995) en la carpa común (*Cyprinus carpio*) varió entre 0,30 -1 mg Cu/L en función de su tamaño (1 y 6 cm de longitud). Lam *et al.* (1998) estimaron para esta misma especie de carpa una dosis de 0,50 mg/L. Hall *et al.* (1997) determinaron que los ciprínidos y salmónidos son más sensibles a exposiciones agudas que otras familias de peces de agua dulce. Para otras especies las DL<sub>50</sub>-96h variaron entre 0,039 mg/L para la trucha de Fontana (*Salvelinus fontinalis*) hasta 0,060 mg/L para el lucio (*Esox lucious*) (Hall *et al.*, 1998). La DL<sub>50</sub> del sulfato de cobre a 96 h para el salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*) fue de 0,29 mg/L, para la perca (*Lepomisma chochirus*) de 0,88 mg/L, para el percasol verde (*Lepomis cyanellus*) de 3,51 mg/L y para las carpitas cabezonas (*Pimephales promelas*), de 0,84 mg/L (U.S. EPA, 1985). No tenemos información sobre las dosis letales establecidas por otros autores para la gambusia, por lo que no podemos establecer una comparación con los resultados obtenidos en nuestro experimento.

En los tres ensayos de toxicidad realizados, las DL<sub>50</sub>-96h fueron de 0,78 mg Cu/l para el agua del grifo (AG), 1,51 mg Cu/l para el agua de las balsas (AB) y 1,90 mg Cu/l para el agua de las balsas sin M.O. (AB-MO). Este hecho pone en evidencia que las características del agua influyen de manera determinante en la toxicidad de éste.

La menor toxicidad del cobre observada en el AB frente al AG se debió a su mayor dureza y materia orgánica; debido a la estrecha relación existente entre el grado de dureza y alcalinidad del agua y la toxicidad del cobre (Velasco *et al.*, 2006). Straus (2003) también obtuvieron una DL<sub>50</sub> para el cobre en *Oreochromis aureus* mayor en aguas con bajos niveles de dureza. La fracción

biodisponible de Cu en el agua puede verse modificada por factores abióticos como el pH, la concentración de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) y el contenido de materia orgánica (Wang, 1987; Mazón y Fernández 1999; Tao *et al.*, 1999). Estos factores tienden a disminuir la toxicidad de  $\text{Cu}^{2+}$ , ya sea reduciendo su concentración o compitiendo por superficie activa de sitios de unión en el tejido de las branquias (Pagenkopf, 1983; Campbell y Stokes, 1985).

Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{H}^+$  modifican la toxicidad de Cu al competir con los iones libres de  $\text{Cu}^{2+}$  por la superficie activa de los sitios de unión de ligandos orgánicos y las membranas biológicas del epitelio branquial (Carvalho and Fernández, 2006). El pH influye de forma importante, una alta concentración de  $\text{H}^+$  (por ejemplo,  $\text{pH} < 5$ ) produce una excesiva protonación de la membrana de las branquias que se traduce en una carga neta positiva que hace que se repelan los iones  $\text{Cu}^{2+}$  (Campbell y Stokes, 1985). Blust *et al.* (1991) expusieron al crustáceo eurihalino *Artemia franciscana* a un aumento en la concentración de cobre y observaron que la absorción de este metal aumentó linealmente en función de su concentración en la solución y esto fue más evidente en aguas alcalinas y neutras más que ácidas.

Por otra parte, un pH alcalino puede favorecer la formación de hidróxidos de cobre y carbonato de cobre y ambos determinan la reducción de la concentración del ión cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) en el agua y, por lo tanto, su toxicidad (Ericsson *et al.*, 1996, MacRae *et al.*, 1999). En nuestro experimento, las tres aguas ensayadas, tenían pH alcalino, lo que supuso una baja toxicidad, fundamentalmente el AB-MO que mostró los valores más altos de pH.

La presencia de materia orgánica en el agua también disminuyó la toxicidad del cobre, como se pudo comprobar por la diferencias observadas entre la  $\text{DL}_{50-96\text{h}}$  del ensayo AB (1,89 mg/L) y el AB-MO (1,51 mg/L). Este hecho está basado en la formación de complejos orgánicos de Cu (DOC), que reducen la toxicidad de Cu por reducción de la concentración del ión libre  $\text{Cu}^{+2}$  (Morel, 1983). El ión  $\text{Cu}^{+2}$  forma fuertes enlaces covalentes con S, N, y O que contienen grupos funcionales (Stumm y Morgan 1981) y se unen a estos grupos funcionales en la formación de ligandos orgánicos. Estos ligandos

orgánicos de Cu generalmente no reaccionan con las membranas biológicas, es decir, no son biodisponibles (Mor el 1983, Campbell 1995).

La causa de la toxicidad del cobre se debe a su acumulación en los sitios fisiológicamente activos en las branquias (Playle *et al.*, 1993, Erickson *et al.*, 1996), que son los órganos donde principalmente se acumula el exceso de cobre en los peces cuando este se encuentra disuelto en el agua (Arellano *et al.*, 1999), mientras que, si entra a través del alimento, se acumula en el hígado (Lloyd, 1992). El nivel de acumulación de cobre en las branquias está directamente con la concentración de  $\text{Cu}^{+2}$  (MacRae *et al.*, 1999), estos autores también encontraron una relación directa entre la acumulación de cobre en las branquias de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y su mortalidad (MacRae, 1994; MacRae *et al.*, 1999). La acumulación de metales en branquias de peces produce alteraciones osmorregulatorias, hemodinámicas y del equilibrio ácido base (Evans, 1987), además de inflamación del epitelio, exceso de producción de mucus con posterior retracción y disolución de los tejidos (Reichenbach-klinke, 1982). La inflamación puede estar relacionada con una disminución de la actividad ATPasaNa-K o con una disminución de la concentración de Na y Cl en la sangre.

En nuestro experimento, las concentraciones de cobre en las branquias de las gambusias al final del ensayo con AG aumentaron de forma proporcional desde 19  $\mu\text{g Cu/g}$  en los peces controles a 200  $\mu\text{g Cu/g}$  en las expuestas a la dosis más alta (4 mg Cu/L).

En el experimento realizado con dosis subletales (0-0,25mg Cu/L) utilizando esta misma agua (Ensayo nº 2), también se observó un aumento proporcional de las concentraciones de cobre en branquias desde 19 y 44  $\mu\text{g Cu/g}$  respectivamente. Estos resultados podrían indicar que concentraciones de cobre en branquias por encima del 44  $\mu\text{g Cu/g}$  pueden resultar letales para la gambusia.

Los resultados obtenidos en otras especies mostraron la misma proporción entre el cobre en el agua y el acumulado en el tejido branquial, en juveniles de *Prochilodus crofa*, oscilaron entre 12 y 22  $\mu\text{g Cu/g}$  cuando fueron expuestos a



concentraciones subletales de cobre entre 0 y 0,029 mg de Cu/L (Mazon y Fernández, 1999). Guzmán *et al.*, (1993) obtuvieron concentraciones de 2 a 4 y 2 a 6  $\mu\text{g Cu/g}$  en branquias de coporo (*Prochilodus mariae*) y Capitán del caribe (*Serrasalmus rhombeus*) capturados del medio natural, respectivamente.

No podemos establecer una comparación entre los resultados obtenidos en nuestro experimento con otros de esta misma especie por carecer de información al respecto. Aunque algunos autores como Guzman *et al.*, (1993) no han encontrado una influencia decisiva de la especie sobre la cantidad de cobre acumulada en las branquias, otros han establecido que la acumulación de metales pesados en los tejidos de peces, en concreto del cobre, se produce por su capacidad para reaccionar con proteínas para formar complejos intracelulares (metalotioneinas, MT) ricas en grupos tiol. Lambot *et al.* (1978), señalaron que el grado de acumulación de Cu, Zn y Cd en el hígado y branquias de *Anguilla anguilla*, está relacionado con la cantidad de MT presentes en dichos órganos.

Estos datos concuerdan con los obtenidos por Rodríguez *et al.*, (2007) en *Eremophilus mutisii*, que sugieren que hay una relación significativa entre la composición de los microelementos en el agua y la acumulación de metales pesados en los tejidos. Esta acumulación se ve afectada por factores físicos y químicos como la temperatura, la dureza del agua, pH y la salinidad (Karakoç *et al.*, 1999).

En resumen, podemos afirmar que la menor toxicidad del agua de las balsas frente a la del grifo, manifestada por su mayor valor de  $\text{DL}_{50-96\text{h}}$ , de debió tanto a la presencia de materia orgánica disuelta natural (que se ha comprobado con el experimento AB-MO) como al mayor contenido en  $\text{Ca}^{2+}$  (mayor dureza) y mayor alcalinidad, estos factores han contribuido a reducir el contenido de  $\text{Cu}^{2+}$  en el agua de las balsas por la formación de complejos de cobre orgánicos e inorgánicos, lo que ha contribuido a una menor acumulación de cobre en las branquias y, por lo tanto, a disminuir sus efectos letales.

## 5.2 Ensayo 2°. Efecto de la exposición a concentraciones subletales de sulfato de cobre.

En el experimento nº 1 de este trabajo hemos observado como dosis altas de cobre provocaron una acumulación en el tejido branquial de gambusia proporcional a la concentración de este metal en el agua y produjo efectos letales en los peces que eran explicados por otros autores por alteraciones osmorregulatorias, hemodinámicas y del equilibrio ácido base, además de inflamación del epitelio, exceso de producción de mucus con posterior retracción y disolución de los tejidos.

Las concentraciones de cobre estudiadas en el experimento nº 2 oscilaron entre 0 y 0,25 mg Cu/L, niveles superiores a las encontradas normalmente en agua dulce, en la que se suele encontrar como metal traza en concentraciones menores de 5 µg/L. Sin embargo, por su uso como fungicida y herbicida puede llegar a concentraciones entre 0,5 y 5 ppm de sulfato de cobre (Boyd, 1990, Casas *et al.*, 2010).

El contenido de lípidos osciló entre 8 a 19% en peso seco, similar a los valores aportados por otros autores en *G. holbrooki* capturadas en el medio silvestre (entre 5 y 20% en peso seco). Los valores más altos en el presente estudio se encontraron en las hembras de la población inicial, que fueron estadísticamente mayores que las de los machos de la misma población y de las hembras de la población final. Otros autores también han encontrado diferencias en las cantidades de lípidos almacenados en los tejidos de gambusias macho y hembras, y lo han explicado como una estrategia de almacenamiento de reservas durante el invierno que permite su reproducción en el comienzo de la primavera (Schultz y Conover, 1999). El contenido de lípidos más bajo encontrado en hembras de la población final en comparación con los de la inicial podría indicar una fase final del estado reproductivo. Cuando las gambusias fueron expuestas a concentraciones crecientes de Cu en el agua, se produjo un aumento en el contenido de lípidos del cuerpo a diferencia de los resultados obtenidos por varios autores en otras especies de peces. Por ejemplo, Boeck *et al.*, (1997) observaron una reducción en la ingesta de alimentos y disminución de crecimiento de la carpa común expuesta a

concentraciones subletales de Cu en el agua. También Ali *et al.* (2003) mostraron que la grasa corporal y el contenido de energía bruta disminuyeron significativamente con la concentración de cobre en el agua en *Oreochromis niloticus*. Estos estudios sugieren un coste fisiológico de la contaminación de Cu a través de la asignación de las reservas de lípidos como una fuente de energía que permite peces expuestos a responder a la sustancia tóxica. Sin embargo, nuestros resultados son consistentes con otros estudios de toxicidad que demuestran el aumento del contenido en lípidos del cuerpo después de la exposición al Cu. Por ejemplo, Liu *et al.*, (2010) encontraron este efecto en *Synecho gobius hasta*, y concluyeron que el aumento de la concentración de cobre se relaciona con la alteración de los lípidos y el metabolismo hepático de las lipoproteínas, que a su vez condujo a un mayor contenido de lípidos en el cuerpo de los peces.

La peroxidación lipídica (LPO) se considera uno de los efectos de la acción tóxica de los contaminantes ambientales (Haque y Raisuddin, 2003), que conduce a pérdida de función celular bajo condiciones de estrés oxidativo (Del Rio *et al.*, 2005). Nuestros resultados muestran que se ha producido una disminución significativa de la peroxidación lipídica en las gambusias expuestas a cobre en cualquiera de las dosis frente a las controles. Esto nos hace suponer la existencia de otro mecanismo protector contra la peroxidación lipídica alternativo a la defensa oxidativa.

El contenido de cobre en las branquias de las gambusias expuestas a cantidades subletales de cobre fue también proporcional a las concentraciones del mismo en el agua, como ya se ha comentado en el ensayo de toxicidad aguda, esta acumulación de cobre se produce por su capacidad para reaccionar con proteínas ricas en grupos tiol para formar complejos intracelulares (metalotioneínas, MTs).

Previamente se ha observado que las MTs están implicadas en la capacidad de regulación / desintoxicación de los organismos contra los metales (Klaassen *et al.*,1999) y en la protección de las células contra el estrés oxidativo (Correia *et al.*,2004). Los aumentos de la concentración de Cu en el agua habrían permitido la síntesis de las MTs, que servirían de protección contra la peroxidación lipídica. En nuestro estudio concentraciones MTs aumentaron con

el nivel de Cu en agua y con la concentración de Cu en las branquias. Del mismo modo, varios autores han detectado una relación directa entre el grado de acumulación de Cu, Zn y Cd en el hígado y branquias y la cantidad de MT presentes en estos órganos (Lambot *et al.*, 1978) en anguila europea, *Anguilla anguilla* (Li *et al.*, 1998), en tilapia *Oreochromis mossambicus* (Dang *et al.*, 1999), y en el pacú, *Piaractus mesopotamicus* (García Sampaio *et al.*, 2010). También Sánchez *et al.* (2005) observaron un aumento rápido de la actividad de las enzimas antioxidantes en el hígado de *Gasterosteus aculeatus* durante la primera semana de exposición a Cu, seguido de una recuperación que coincidió con la acumulación de Cu en el hígado.

La disminución de los niveles de peroxidación lipídica en los peces expuestos a concentraciones subletales de cobre podría estar también relacionada con la síntesis de las MTs. De hecho, en el anfípodo *Gammarus*, se observaron altos niveles de peroxidación lipídica antes de la formación de MTs, pero después de su formación los niveles disminuyeron (Correia *et al.*, 2002). Cuando las cantidades de Cu en agua son bajas como en nuestra población inicial, la síntesis de las MTs es marginal, lo que provoca daños oxidativos (Maazouzi *et al.*, 2008).

## CONCLUSIONES.

---

---

## 6. CONCLUSIONES.

1. Las DL<sub>50</sub>-96 h fueron de **0,78 mg Cu/L** para el agua del grifo (AG), **1,90 mg Cu/L** para el agua de las balsas (AB) y **1,51 mg Cu/L** para el agua de las balsas sin M.O. (AB-MO). Este hecho puso en evidencia que las características del agua influyeron de forma decisiva en la toxicidad del cobre para esta especie.
2. En el agua del grifo y la de las balsas sin materia orgánica se observó una relación directa dosis-respuesta entre la concentración de cobre y la mortalidad que solamente se observó en el agua de las balsas hasta las dosis más bajas de cobre (por debajo de 1,5 mg/l), por encima de esa dosis no aumentó la mortalidad, debido a la menor toxicidad del cobre en esta agua.
3. La menor toxicidad del cobre en el agua de las balsas frente a la del grifo se debió tanto a la presencia de materia orgánica natural (que se ha comprobado con el experimento AB-MO) como al mayor contenido en Ca<sup>2+</sup> (mayor dureza) y mayor alcalinidad. Estos factores han contribuido a reducir el contenido de iones libres cobre en el agua de las balsas por la formación de complejos de cobre orgánicos e inorgánicos, lo que ha contribuido a una menor acumulación de cobre en las branquias y, por lo tanto, a disminuir sus efectos letales.
4. La exposición a dosis subletales de cobre produjo una disminución significativa de la peroxidación lipídica. Esto nos hizo suponer la existencia de otro mecanismo protector contra la peroxidación lipídica, que podría estar relacionado con el aumento del contenido de MTs y de cobre en las branquias al aumentar la exposición al mismo.

## BIBLIOGRAFÍA.

---

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

**Abellán, P., Sánchez-Fernández, D., Millán, A., Botella, F., Sánchez-Zapata, J.A., Giménez, A., 2006.** Irrigation pools as macroinvertebrate habitat in a semi-arid agricultural landscape (SE Spain). *Journal of Arid Environments* 67: 255–269.

**Aebi, H., 1984.** Catalase “in vitro”. *Methods Enzymol.* 105: 121–127.

**Ahmad, S. 1995.** Preface. In *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Chapman & Hall, NY, xi–xvii.

**Allan, J.D., Flecker, A. S. 1993.** Biodiversity conservation in running waters. *BioScience* 43 : 32–43.

**Allen, H., Hansen, D. 1996.** The importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Water Environment Research*. Vol. 68 No. 1.

**Alquezar, R., S., Booth, D. Booth. 2005.** Metal accumulation in the smooth toadfish, *Tetractenos glaber*, in estuaries around Sydney, Australia. *Environmental Pollution* XX: 1 - 9.

**Annabi, A., Messaoudi, I., Kerkeni, A., Said, K. 2009.** Comparative study of the sensitivity to cadmium of two populations of *Gambusia affinis* from two different sites. *Environ Monit Asses* 155: 459-465.

**Baker, S., Herrchen, M., Hund-Rinke, K., Klein, W., Kordel, W., Peijnenburg, W., Rensing, C. 2003.** Underlying issues including approaches and information needs in risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56 : 6-19.

**Blust, R., Fontaine, A., Decler, W. 1991.** Effect of hydrogen ions and inorganic complexing on the uptake of copper by the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 76: 273-282

**Boeck, G., Vlaeminck, A., Blust, R. 1997.** Effects of sublethal copper exposure on copper accumulation, food consumption, growth, energy stores and nucleic acid content in common carp. *Arch. Environ. Toxicol.*, 33: 415-422.

**Bonachela, S., Acuña, R.A., Casas, J., 2007.** Environmental factors and management practices controlling oxygen dynamics in agricultural irrigation ponds in a semiarid Mediterranean region: Implications for pond agricultural functions. *Water Research* 41: 1225 – 1234

**Boyd, C.E.1990.** In: *Water quality in ponds for Aquaculture*. Alabama Agricultural Experiment Station. Auburn University. Birmingham Publish Co, Alabama. 482 pp.

**Buege, J.A., Aust, S.D. 1978.** Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302-310.

**Campbell, P.G.C. 1995.** Interactions between trace metals and organisms: critique of the free-ion activity model. In *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. Edited by A. Tessier and D.R. Turner. John Wiley & Sons, New York, 45.102.



**Campbell, P.G.C., Stokes, P.M. 1985.** Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 2034-2049.

**Carbonell, G., Tarazona, J.V. 1993.** A proposed method to diagnose acute copper poisoning in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci Total Environ Suppl* 1993:1329–1334

**Carlberg, L., Mannervik, B. 1975.** Purification and characterization of the flavo enzymes glutathione reductase from the rat liver. *J. Biol. Chem.* 250: 5475-5480.

**Carvalho, C.S., Fernandes, M.N. 2006.** Effects of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture* 251:109– 117

**Casas, J., Sánchez, J., Sanz, A., Furné, M., Juan, M., Paracuellos, M., Suárez, M.D., Trenzado, C., Fuentes, F., Gallego, I., Gil, C., and Ramos, J.J. 2010.** The paradox of the conservation of an endangered fish species in a Mediterranean region under agricultural intensification: Artificial versus natural aquatic habitats. Pendiente de publicación.

**Casas, J., Toja, J., Bonachela, S., Fuentes, F., Gallego, I., Juan, M., León, D. Peñalver, P., Pérez, C., Sánchez, P. 2010.** Artificial ponds in a Mediterranean region (Andalusia, Southern Spain): Agricultural and environmental issues. *Water and Environment Journal* (doi:10.1111/j.1747-6593.2010.00221.x).

**Castañeda, O. 1999.** Determinación de la toxicidad en lodos generados por una planta potabilizadora, utilizando bioensayos. CENAPRED, México. 15 pp.

**Castillo, G. 2004.** Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IDRC/IMTA. 202p.

**Cepeda, W. 2000.** Estimación del riesgo ecológico asociado a las descargas de efluentes urbanos en el curso medio del río Cautín comuna de Temuco, IX región. Tesis presentada a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de Temuco, Chile, para Optar al Grado de Licenciado en Recursos Naturales. 55 pp.

**Chubatsu L. S., Meneghini R. 1993.** *Biochem. J.* 291, 193–198

**Connors, D.E., Ringwood, A. H. 2000.** Effects of glutathione depletion on copper cytotoxicity in oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquatic Toxicol.* 50: 341-349.

**Correia, A.D., Sousa, A., Costa, M.H., Moura, I., Livingstone, D.R. 2004.** Quantification of metallothionein expression in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: amphipoda) using differential pulse polarography. *Toxicol. Environ. Chem.* 86: 23-36.

**Cowey, C.B., Adron, J.W., Walton, M.J., Murray, J., Youngson, A. Knox, D. 1981.** Tissue distribution, uptake, and requirement for a-tocopherol of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed diets with a minimal content of unsaturated fatty acids. *J. Nutr.* 3:1556–1567.

- Dalton, T.P., Palmiter, R.D., Andrews, G.K. 1994.** Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major late transcription factor/antioxidant response element and metal response promoter elements. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5016–5023.
- Dautremepuits C, Betoulle S, Vernet G . 2002.** Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. *Biochim Biophys Acta* 1573:4–8
- Dautremepuits, C., Betoulle, S., Paris-Palacios, S., Vernet, G. 2004.** Immunology related perturbations induced by copper and chitosan in carp (*Cyprinus carpio* L.) *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **47**: 370-378.
- Davies, K.J.A. 2000.** Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* **61**: 1–31.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1995.** Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: Rand, G. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Taylor and Francis, London, 523-561.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., Jewell, C.S., 1989.** Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**: 1103–1123.
- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.I., Knowler, D.J., Leveque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.H., Soto, D., Stiassny, M.L.J., Sullivan, C.A., 2006.** Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* **81**: 163–182.
- Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Do'rr, A.J.M., Mantilacci, L., 2003.** Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **55**: 162e167.
- Encina, F., Díaz, O. 2000.** Contaminación, estimación del riesgo ecológico y protección asociado de algas bentónicas marinas. Universidad Católica de Temuco- Universidad de Chile. 13 pp.
- EPA ,1998.** Guidelines for Risk Assessment. Washington DC, USA. 114 pp.
- EPA, 1995.** Ambient Water Quality Criteria Doc: Cadmium p.59.
- EPA, 1999.** Biosolids generation, use, and disposal in the United States. Washington, DC: Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste, EPA530-R-99-009.
- Erickson, R.J., Benoit, D.A., Mattson, V.R., Nelson Jr, H.P., Leonard, E.N., 1996.** The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**: 181-193.
- Evaluación de los Ecosistemas del Milenio, 2005.**
- Fargasova, A. 1998.** Comparative acute toxicity of Cu, Mn, Mo, Ni, and V to *Chironomus plumosus* larvae and Tubifex worms. *Biologia*, **53**, 315–319.

**Flohé, L., Günzler, W.A. 1984.** Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105: 115-121.

Florence, G., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M.J., 2002. Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussates*. *Marine Environmental Research* 54: 413-417.

**Freedman, M.H., Cohen, A., Grunherger., T . 1989.** Central role of TNF and GM-CSF in the pathogenesis of juvenile chronic myelogenous leukemia. *Br. J. Hemato*, 80: 40-48.

**Gaete, H., Bay-Schmith, E., Riveros, A. 2005.** *Rev. Int. Contam. Ambient.* 21 (2): 83-89.

**GEIB, TOP 20 2006.** Las 20 especies exóticas invasoras más dañinas presentes en España. GEIB, Serie Técnica, N2, Pp116.

**Guzmán, R., Reyes, A., Barreto, M., Gómez, G. 1993.** Contenido de cobre en el coporo (*Prochilodus mariae*) y en el caribe (*Serrasalmus rhombeus*) de laguna grande, estado Monagas. *Zootecnia Tropical*, 11(1):59-69.

**Habig, W.,H.; Pabst, M.J., Jakoby, W.B. 1974.** Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in the mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.

**Hahn, W. E., Tinkle, D.W.. 1965.** Pat body cycling and experimental evidence for its adaptive significance to ovarian follicle development in the lizard, *Uta stansburiana*. *J. Exp. Zool.* 158: 79-86.

*halbrooki* living downstream of a paper mill. *Aquat. Toxicol.* 70: 213-222.

**Hall, L.W., Sott, M.C., Killen, W. D. 1998.** Ecological risk assessment of copper and cadmium in surface waters of Chesapeake Bay Watershed. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol 17, nº 6: 1172-1189.

**Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2000.** *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3a ed. Oxford University Press, Oxford.

**Harris, E.D.1991.** Copper transport: An overview . *Proc. Soc. Exp. Med.*, 192: 130-140.

**Henderson ,R.J., Tocher, D.R. 1987.** The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid. Res.* 26: 281-347

**Hollis, J. M., Vogel, S. N., Snyder, L. E., Jewell, P. R., Lovas, F. J. 2001.** Cyclopropenone (c-h2c3o): a new interstellar ring molecule. *ApJ*, 554, L81

**Horn, M. J., Stewart, A. J. 1990.** Response of mosquitofish (*Gambusia affinis*) populations to seasonal/ly unpredictable perturbations. *Environmental Sciences Division Publication No.* 3458

**Hu, Z. A., & Wang, H. X. 2001.** Molecular mechanism of stress adaptation in plant natural populations. *Acta Botanica Sinica*, 43: 111–118.

**Ivorra, N., Barranguet, C., Jonker, M., Kraak, M. H. S., Admiraal, W. 2002.** Metal-induced tolerance in the freshwater microbentic diatom *Gomphonema parvulum*. *Environmental Pollution*, 116, 147–157. doi:10.1016/S0269-7491(01)00152-X.

- Jones, J.R.E. 1973.** Fish and river pollution. Butterworth & Co. (Publishers), London: 203 p.
- Karakoç T. 1999.** Effects of Salinity on the Accumulation of Copper in Liver, Gill and Muscle Tissues of *Tilapia nilotica* J. of Zoology, 23: 299-303
- Klaassen, C. D., Liu, J. y Choudhuri, S. 1999.** Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. Annual Review of
- Kochert, G. 1978.** Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. Pp. 95–97, en Hellebust y J. Craigie (eds.), Handbook of physiological methods. Physiological and biochemical methods. Cambridge Univ. Press, Cambridge, Reino Unido.
- Lambot , F., Bouquegneau, J. M., Frankenne, F., Disteché, A. 1978.** Le rôle des metallothionéines dans le stockage des métaux lourds chez les animaux marins. Rev. Int. Océanogr. Méd. 49: 13-19.
- Langston, W.J., Chesman, B.S., Burt, G.R., Pope, N.D., McEvoy, J., 2002.** Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality? Mar. Environ. Res. 53: 263–293.
- Larraín, A. 1995.** Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. Ciencia y Tecnología Marina CONAMA, Chile (Nº especial) 39-47.
- Lenwood, W.H.Jr., Scott, M.C., Killen, W.D. 1998.** Ecological risk assessment of copper and cadmium in surface waters of Chesapeake Bay watershed. Environ. Toxicol. Chem., 17: 1172-1189.
- Livingstone, D.R., 2001.** Contaminated-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Marine Pollution Bulletin 42, 656e666.
- Lloyd, R. 1992.** Pollution and freshwater fish. Fishing News Books (Oxford): 176 p.
- Lopretto C., Tell, G. 1995.** Ecosistemas de aguas continentales metodologías para su estudio. Ediciones Sur, Argentina. 377
- Lowe, S. M., Browne, S., Boudjelas, M., De Poorter, M. 2004.** 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the global invasive species database published by the invasive species specialist group (ISSG) a specialist group of the species survival commission (SSC) of the world conservation union (IUCN). Suiza.
- Maazouzi, C., Masson, G., Izquierdo, M.I., Pihan, J.C. 2008.** Chronic copper exposure and fatty acid composition of the amphipod *Dikerogammarus villosus*: Results from a field study. Environmental Pollution xx: 1-6.
- MacRae, R.K. 1994.** The copper binding affinity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*) gills. MS. University of Wyoming.
- MacRae, R. K., Smith, D. E., Swoboda-Colberg, N., Meyer, J. S. & Bergman, H. L. 1999.** The copper binding affinity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*) gills. Environmental Toxicology and Chemistry, 18: 1180-1189.

- Madoni, P., Romeo, M.G., 2006.** Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. *Environmental Pollution* 141: 1-7.
- Marr, J.C.A., Hansen, J.A., Meyer, J.S., Cacula, D, Podrabsky, T., Lipton, J., Bergman, H.L. 1998.** Toxicity of cobalt and copper to rainbow trout: application of a mechanistic model for predicting survival. *Aquat. Toxicol.* 43: 225-238.
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005.** Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15: 75–88.
- Massaut, L. 1999.** Manejo de sabores/olores no deseados (off-flavor) en cultivo de camarón en el Ecuador. *El Mundo Acuícola*, 5: 24-26.
- Mazon, A. F.; Fernández, M. N. 1999.** Toxicity and Differential Tissue Accumulation of Copper in the Tropical Freshwater Fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Environ. Contam. Toxicol.* 63:797—804
- Mazzouzi, C., Masson, G., Izquierdo, M.I., Pihan, J.C. 2008.** Chronic copper exposure and fatty acid composition of the amphipod *Dikerogammarus villosus*: Results from a field study. *Environmental Pollution* xx (2008) 1e6.
- Mc Cord, J.M.; Fridovich, J. 1969.** Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
- Metcalf, E. 1995.** INC. Ingeniería de aguas residuales. Mc Graw Hill. 3ª Edición (1995)
- Morel, F.M.M. 1983.** Principles of aquatic chemistry. John Wiley & Sons, New York.
- Moss, B., 2008.** Water pollution by agriculture. *Philosophical Transactions of The Royal Society of Britain* 363: 659–666.
- Nakano, T., Miura, Y., Wazawa, M., Sato, M., Takeuchi, M. 1999.** Red yeast *Phaffia rhodozyma* reduces susceptibility of liver homogenate to lipid peroxidation in rainbow trout. *Fish. Sci.* 65: 961-962.
- Nunes, B., Gaio, A.R., Carvalho, F., Guilhermino, L. 2008.** Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and detergent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 341-354.
- Ochoa, D.M., González, J.F. 2008.** Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales ev. *Med. Vet. Zoot.* 2008. 55:115-126.
- Ortiz- Delgado, J.B., Gonzalez de Canales, M.L., Sarasquete, C. 1999.** Cuantificación y alteraciones histopatológicas producidas por concentraciones subletales de cobre en *Fundulus heteroclitus*. *Cienc. Mar.* 25(1): 119-143.
- Orueta, J.F. 2007.** Vertebrados invasores: problemática ambiental y gestión de sus poblaciones. Organismo autónomo de Parques Nacionales. Ministerio de Medio Ambiente. España. Pp 351.
- Pagenkopf, G.K. 1983.** Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environ. Sci. Technol.* 17: 342.347.
- Paris-Palacios, S., S. Biagianti-Risbourg, G. Vernet, 2000.** Metallothioneins analysis in liver of *Rutilus rutilus* exposed to Cu with three methods: Metal

summation, SH determination and original spectrofluorimetric method. *Comp. Biochem. Physiol.*, 126: 113-122.

**Pedrajas, J.R., Peinado, J., López-Barea, J. 1995.** Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chemico Biological Interactions*, vol. 98, 3: 267-282.

*Pharmacology and Toxicology* 39: 267-294.

**Pimentel, D., Berger, B., Filiberto, D., Newton, M., Wolfe, B., Karabinakis, E., Clark, S., Poon, E., Abbett, E., Nandagopal, S., 2004.** Water resources: Agricultural and environmental issues. *BioScience* 54: 909-918.

**Playle, R.C.; Dixon, D.G., Burnison, K. 1993.** Copper and cadmium binding to fish gills: estimates of metal –gills stability constants and modelling of metal accumulation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 2678-2687.

**Primack, R.B. , Ros, J. 2002.** Introducción a la biología de la Conservación. Ariel S.A.(Ed). Barcelona. Pp375.

**Rahel, F. J. 2002.** Homogenization of freshwater faunas. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 291–315.

**Ramelow, G.J., C.L., Webre, C.L., Mueller, J.N., Beck, J.C., Young, M.P., Langley. 1989.** Variations of heavy metals and arsenic in fish and other organisms from the Calcasien river and lake, Louisiana. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology* 18: 804 - 818.

**Reichelt-Brushett, A. J., Harrison, P. L., 1999.** The effect of copper zinc and cadmium on fer tilization success of gamentes from scleratinian reff corals. *Mar. Poll. Bull.* Vol. 38 N° 3:182-187.

**Reichenbach-klinke, 1982.** Enfermedades de los peces. Editorial Zaragoza, España.

**Reznick, D. N., Ghalambor, C. K. 2001.** The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptative evolution. *Genetica*, 112, 183–198. doi:10.1023/A:1013352109042.

**Ricciardi, A., Rasmussen, J.B., 1999.** Extinction rates of North American freshwater fauna. *Conservation Biology* 13: 1220-1222.

**Rikans, L.E., Hornbrook, K.R., 1997.** Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochimica et Biophysica Acta* 1362, 116-127.

**Robinson, J., Avenant-Oldewage, A. 1997.** Chromium, copper, iron and manganese bioaccumulation in some organs and tissues of *Oreochromis mossambicus* from the lower Olifants River, inside the Kruger National Park. *Water SA*, vol 23, n°4: 387-403.

**Rodríguez A., González, J.F., Suarez, R. 2007.** Bioacumulación por metales pesados en el capitán de la sabana (*Eremophilus mutisii*), habitante de la cuenca alta del río Bogotá. *Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola* año II, vol. 2, 2007. ISSN 1909 – 8138.

**Sala, O.E., Chapin III, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M., Wall, D.H., 2000.** Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287: 1770-1774.

**Sarasquete, C., Gonzalez de Canales, M.L., Blasco, J., Capeta Da Silva, D., Arellano, J.M., Gutiérrez, M. 1997.** Histochemical distribution and accumulation of trace metals in the Heart of green and normal *Crassostrea angulata* specimens from different southwest Spanish coast. *Eur. J. Histochem.*, 41: 139-148.

**Schultz, E. T., Conover, D.O. 1999.** The allometry of energy reserve depletion: test of mechanism for size-dependent winter mortality. *Oecologia* 119: 474-483.

**Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., Von Gunten, U., Wehrli, B. 2006.** The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313:1072–1077

**Sebastian-González, E., Sánchez-Zapata, J. A., Botella, F., 2010.** Agricultural ponds as alternative habitat for waterbirds: spatial and temporal patterns of abundance and management strategies. *European Journal of Wildlife Research* 56: 11–20.

**Sponza, D. 2003.** Application of toxicity test into discharges of the pulp-paper industry in Turkey. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 74-86.

**Stohs, S.J., Bagchi, D. 1995.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* 18:321-336.

**Straus, D.L.2003.** The acute toxicity of copper to blue tilapia in dilutions of settle pond water. *Aquaculture* 219: 233-240.

**Stumm, W.,Morgan, J.J. 1981.** Aquatic chemistry. An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters. John Wiley & Sons, Toronto, Ont.

**Sturve,J., Stephensen, E., Förlin, L. 2005.** Effects of redox cycling compounds on DT diaphorase activity in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Comparative Hepatology* 2005, 4:4, 2-8

**Tao, S., Liangt, T., Cao, J., Dawson, R., Liu, C.F. 1999** Synergistic effect of copper and lead uptake by fish. *Ecotoxicol Environ Saf* 44:190–195

**Thornton, J.A., Rast, W. 1997.** The use of copper and copper compounds as algicides. In: Richardson WT (ed) *The handbook of copper compounds and applications*. CRC Press, Boca Raton, 123–142

**Toft, G., E. Baatrup, L. Guillette, Jr. 2004.** Altered social behavior and sexual characteristics in *Gambusia*

**Troncoso, A., Gnaedinger, S., Herbst, R. 2000.** *Heidiphyllum*, *Rissikia* y *Desmiophyllum* (Pinophyta, Coniferales) en el Triásico del Norte Chico de Chile y sur de Argentina. *Ameghiniana* 37(1):119-126

**USGS. Science for a Changing World. 2000.** Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) Program: Selected Methods for Monitoring Chemical

Contaminants and their Effects in Aquatic Ecosystems. Editors Christopher J. Schmitt, Gail M. Dethloff, USA. 81 pp.

**Van Dam, R.A., Camilleri, C., Finlayson C.M. 1998.** The potential of rapid assessment techniques as early warning indicators of wetland degradation : a review. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 13: 297-312.

**Van Heerden, D., A., Vosloo, M., Nikinmaa. 2004.** Effects of short-term copper exposure on gill structure, metallothionein and hypoxia-inducible factor-1 (HIF- 1) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 69: 271 - 280.

**Varanasi, V., Gmur, D.J. 1978.** Influence of water-borne and dietary calcium on uptake and retention of lead by coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 45: 56-75.

**Varanka, Z., Rojik, I., Varanka, I., Nemcsok, J., Abraham, M., 2001.** Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulphate and tannic acid. *Comp. Biochem. Physiol C.*, 128: 467 – 478.

**Varo,I., Nunes B., Amat, F.,Torreblanca1,A., Guilhermino, L., Navarro, J.C. 2007.** Effect of sublethal concentrations of copper sulphate on seabream *Sparus aurata* fingerlings. *Aquat. Living Resour.* 20, 263–270.

**Velasco, Y.M., Gómez, W., Calderon, J.M. 2006.** Toxicidad aguda del sulfato de cobre en alevinos de cachama blanca (*Piaractus Brachypomus*) bajo condiciones de aguas blandas. *Revista Orinoquia.* Vol 10, N° 1: 64-70.

**Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A. and Fabbri, R. 1999.** Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers*, 4(6): 455–466.

**Vighi, M., Alteburger, R., Arrhenius, A., Backhaus, T., Bödeker, W., Blanck, H., Consolaro, F., Faust, M., Finizio, A. 2003.** Water quality objectives for mixtures of toxic chemicals: problems and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 139-150.

**Vutukuru, S., Chintada, S., Madhavi, R., Rao, JV, Anjaneyulu, J. 2006.** Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus* *Fish Physiol Biochem*, 32:221–229

**Wang, W. 1987.** Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms: overview. *Environ. Int.* 13: 437-457.

**Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991.** Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161.

**Xenopoulos, M. A., Lodge, D. M., Alcamo, J., Marker, M., Schulze, K., van Vuuren, D. P., 2005.** Scenarios of freshwater fish extinctions from climate change and water withdrawal. *Global Change Biology* 11, 1557–1564.

**Zelikoff, J.T., Bowser, D., Squibb, K.S., Frenkel, F. 1995.** Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish: an alternative animal model for immunotoxicological studies. *J. Toxicol. Environm. Health* 45: 235-248.