

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Toxicología y Farmacología



**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD
BIOINDICADORA DE PLANTAS Y ARTRÓPODOS
EN LA TOXICIDAD DEL METIL-MERCURIO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Dolores Álvarez Menéndez

Bajo la dirección de los doctores
Miguel A. Capó Martí
M^a Victoria Peinado de diego

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-2153-2

T 25671

TESIS DOCTORAL



BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5314043168

**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOINDICADORA
DE PLANTAS Y ARTRÓPODOS EN LA TOXICIDAD
DEL METIL-MERCURIO”**

María Dolores Álvarez Menéndez
Licenciada en Veterinaria

Directores:

Prof. Dr. D. Miguel A. Capó Martí

Prof^a. Dr^a. D^a. M^a Victoria Peinado de Diego

**DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

Madrid (2001)

D. Miguel A. Capó Martí, Doctor en Veterinaria y Profesor Titular del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y

D^a M^a Victoria Peinado de Diego, Doctora en Biológicas y Directora del Departamento de Biología y Sanidad del Instituto Universitario de Ciencias Ambientales de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN

que D^a M^a Dolores Álvarez Menéndez, licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "Evaluación de la capacidad bioindicadora de plantas y artrópodos en la toxicidad del metil-mercurio", que reúne los requisitos necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral.

Madrid, 29 de Enero de 2001



Dr. M.A. Capó Martí



Dra. M.V. Peinado de Diego

AGRADECIMIENTOS

GRACIAS:

- A los directores de ésta Tesis, Profesores Dr. D. Miguel A. Capó Martí, de la Facultad de Veterinaria y Dra. D^a M^a Victoria Peinado de Diego del Instituto Universitario de Ciencias Ambientales (IUCA) de la Universidad Complutense de Madrid. El primero se hizo cargo, pacientemente, de mi despiste de post-graduada encauzándolo hacia la investigación mediambiental y minimizando con alegre sentido mediterráneo del humor, las para mí, inasequibles dificultades logísticas del proyecto, al tiempo que las resolvía. La segunda me acogió en su Departamento, poniendo generosamente a mi disposición tanto su experiencia académica como su reconocida solvencia entomológica. Para ambos, mi reconocimiento por su dirección científica, por su docencia y mi gratitud por su apoyo, orientación y, sobre todo, por su amistad.

- Al Profesor Dr. D. Alejandro López López, director del IUCA y al Departamento de Biología y Sanidad de dicho Centro, por permitirme el uso, para mi imprescindible, de sus instalaciones y de su equipo humano.

- Al Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Veterinaria de la UCM y en especial a la Prof. Dra. D^a M^a Luisa García Sanz. Y mis mejores y agradecidos recuerdos para todos aquellos profesores de mi Facultad de Veterinaria que tan cariñosamente acogieron a una estudiante ya madura.

- Muy especialmente a D. Julián Mateos Martín, biólogo, inicial y aparentemente inalcanzable para el recién llegado al IUCA por su velocidad mental de proceso, capacidad agotadora de trabajo, genialidad para el diseño experimental y apabullante habilidad resolutive para los problemas, hasta que una se da cuenta que, por su solidaridad y humanidad, es el maestro y compañero de trabajo ideal.

- Al Prof. Dr. D. Rafael Suárez Álvarez, de la Facultad de Medicina, por su infinita paciencia y constante ayuda en la elaboración de esta tesis. Sus recomendaciones de diseño y su seguimiento crítico de los resultados han sido inestimables en la realización de la parte bioestadística de este trabajo.

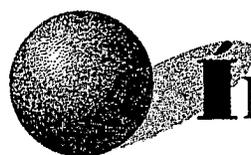
- A mis hijos Rafael y Jorge, a mis hermanas Conchita y Fini y a la memoria de mis padres, que hubieran disfrutado simplemente con la visión de un ejemplar de este trabajo y a los que siempre llevaré en mi corazón.

- A mis amigos, cuya compañía, fé y ánimos, hicieron más llevadera las cargas pesadas del trabajo de "fondo".

- Al Departamento de Química Agrícola, Edafología y Geoquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, por su colaboración en el desarrollo de parte de la investigación.

- Finalmente, a Rafael Cabello y a Noemí Alvite por crear un ambiente propicio durante la realización de este trabajo.

A Rafa.



ÍNDICE

Capítulo 1

1. INTRODUCCIÓN PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	2
1.1. Planteamiento y objetivos.....	3
1.2. Diseño de trabajo	4
1.3. Referencias.....	10

Capítulo 2

2. ECOTOXICOLOGÍA DEL MERCURIO	12
2.1. Introducción.....	12
2.2. Propiedades físico-químicas	16
2.3. Ciclo global del mercurio.....	18
2.4. Biomagnificación del mercurio en la cadena alimentaria.....	21
2.5. Producción y usos.....	22
2.5.1. Ocupacional.....	22
2.5.2. Doméstico.....	23
2.5.3. Medicamentoso	23
2.5.4. Alimentaria.....	23
2.6. Características toxicocinéticas	24
2.6.1. Absorción.....	24
2.6.2. Vida media.....	25
2.6.3. Transporte y Distribución	25
2.6.4. Biotransformación.....	26
2.6.5. Eliminación	26
2.7. Características toxicodinámicas	27
2.7.1. Acciones tóxicas principales.....	27
2.7.2. Principales efectos tóxicos.....	28
2.8. Efectos tóxicos del metilmercurio.....	29
2.8.1. Factores que modifican la toxicidad del metilmercurio.....	31
2.8.2. Tratamiento.....	31
2.9. Aspectos Ecotoxicológicos: Modelo Compartimental del Hg y metilmercurio....	32
2.9.1. Ciclo del agua.....	32
2.10. Referencias.....	36

Capítulo 3

3. BIOINDICADORES	42
3.1. Definición y características.....	42
3.2. Tipos de bioindicadores	43
3.3. Caracterización de bioindicadores	45
3.4. Requisitos que deben cumplir los bioindicadores.....	46
3.5. Ventajas de los bioindicadores.....	47
3.6. Bioensayos.....	48
3.7. Cuantificación experimental de los efectos ecotoxicológicos.....	51
3.7.1. Medición de cambios dinámicos de poblaciones.....	54
3.7.1.1. Métodos de competición acuáticos.....	54
3.7.1.2. Métodos de competición en ecosistemas terrestres.....	54
3.7.1.3. Métodos de depredación.....	55
3.7.1.4. Métodos de interacción huesped-parásito.....	56
3.7.1.5. Métodos de simbiosis.....	56
3.7.2. Estudios de los procesos del ecosistema.....	57
3.7.2.1. Métodos acuáticos.....	57

3.7.2.2. Métodos de simulación de ecosistemas.....	58
3.7.2.3. Métodos de multipoblación generalizada.....	59
3.7.2.4. Métodos de metodología alternativa.....	59
3.7.3. Uso de bioindicadores.....	59
3.7.3.1. Cultivos celulares y líneas celulares.....	60
3.7.3.2. Biosensores y biomarcadores.....	60
3.7.3.3. Animal centinela y animal filtro.....	60
3.8. Referencias.....	62

Capítulo 4

4. METODOLOGÍA Y TRATAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.....	65
4.1. Metodología de formato y específica.....	65
4.2. Soporte bibliográfico: Búsqueda.....	65
4.3. Metodología estadística.....	66
4.3.1. Definición de las variables.....	66
4.3.2. Procedimiento estadístico.....	67
4.3.3. Estadísticos aplicados.....	67
4.3.3.1. Análisis de riesgos.....	68
4.3.3.2. Análisis de la capacidad biomedidora y sensibilidad.....	70
4.3.3.3. Soportes informáticas.....	70
4.4. Referencias.....	71

Capítulo 5

5. EXPERIMENTACIÓN VEGETAL.....	73
5.1. Germinación de semillas.....	73
5.1.1. Factores internos.....	74
5.1.2. Factores externos.....	75
5.1.3. Utilización de las sustancias de reserva.....	76
5.1.4. Crecimiento de las plantas.....	77
5.2. Gramíneas.....	80
5.2.1. <i>Hordeum vulgare</i>	82
5.2.1.1. Subproductos de la cebada.....	83
5.2.1.1.1. Productos de la Industria cervecera.....	83
5.2.1.1.2. Residuos de destilería y solubles de destilería.....	83
5.2.1.1.3. Subproductos de la Industria de la cebada perlada.....	84
5.2.2. <i>Zea mays</i>	84
5.2.2.1. Subproductos del maíz.....	85
5.3. Leguminosas.....	85
5.3.1. <i>Lens culinaris</i>	87
5.3.2. <i>Vicia faba</i>	87
5.4. Objetivos.....	89
5.5. Material y métodos.....	89
5.5.1. Material.....	89
5.5.2. Metodología.....	90
5.6. Resultados.....	95
5.6.1. Bioindicador: <i>Hordeum vulgare</i>	97
5.6.1.1. Germinación.....	97
5.6.1.2. Crecimiento.....	100
5.6.2. Bioindicador: <i>Zea mays</i>	105
5.6.2.1. Germinación.....	107
5.6.2.2. Crecimiento.....	110

5.6.3. Bioindicador: <i>Lens culinaris</i>	114
5.6.3.1. Germinación.....	117
5.6.3.2. Crecimiento.....	120
5.6.4. Bioindicador: <i>Vicia faba</i>	123
5.6.4.1. Germinación.....	125
5.6.4.2. Crecimiento.....	128
5.6.5. Resultado del estudio comparativo de las cuatro especies botánicas...	132
5.6.5.1. Germinación.....	133
5.6.5.2. Crecimiento.....	136
5.7. Discusión.....	142
5.8. Conclusiones.....	149
5.9. Referencias.....	154

Capítulo 6

6. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL I: ARTRÓPODOS ACUÁTICOS: ZOOPLANCTON...	158
6.1. Branquiópodos.....	159
6.1.1. Orden cladocera.....	159
6.1.1.1. Morfología externa.....	160
6.1.1.2. Morfología interna.....	161
6.1.1.3. Desarrollo.....	161
6.1.1.4. <i>Daphnia</i>	163
6.1.1.5. <i>Bosmina</i>	165
6.1.1.6. <i>Chydorus</i>	166
6.2. Copépodos.....	168
6.2.1. Descripción.....	169
6.2.2. Morfología interna.....	170
6.2.3. Desarrollo.....	172
6.2.4. Consideraciones generales sobre la flotación y los movimientos.....	172
6.2.5. Orden cyclopoide.....	173
6.2.6. Orden Calanoide.....	174
6.3. Migración vertical y distribución espacial en Cladoceros y Copépodos.....	176
6.4. Objetivos.....	179
6.5. Material y métodos.....	179
6.5.1. Material.....	179
6.5.2. Metodología.....	183
6.6. Aspectos estadísticos.....	187
6.7. Resultados.....	188
6.7.1. Fototaxia.....	190
6.7.2. Mortalidad.....	190
6.7.3. Capacidad biomedidora.....	193
6.8. Discusión.....	196
6.9. Conclusiones.....	201
6.10. Referencias.....	203

Capítulo 7

7. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL II : ARTRÓPODOS TERRESTRES	207
7.1. <i>Steropleurus stali</i>	208
7.1.1. Descripción.....	208
7.1.2. Biología.....	211
7.1.3. Distribución.....	212
7.1.4. Capturas.....	212
7.2. <i>Nemobius sylvestris</i>	213

7.2.1. Descripción.....	213
7.2.2. Biología.....	216
7.2.3. Distribución.....	216
7.2.4. Capturas.....	217
7.3. Objetivos.....	220
7.4. Material y métodos.....	220
7.4.1. Material.....	220
7.4.2. Metodología.....	221
7.5. Resultados.....	225
7.5.1. Bioindicador: <i>S. stali</i>	226
7.5.2. Bioindicador: <i>N. sylvestris</i>	233
7.5.3. Estudio comparativo de los Ortópteros.....	242
7.6. Discusión.....	247
7.7. Conclusiones.....	252
7.8. Referencias.....	254

Capítulo 8

8. SÍNTESIS Y CONCLUSIONES FINALES.....	258
8.1. Síntesis.....	258
8.2. Conclusiones finales.....	265
8.3. Referencias.....	267

ÍNDICE DE FIGURAS

- 1.1.- Perfil esquemático de la vegetación del sector oriental de Guadarrama
- 1.2.- Monitorización de cinco cotas de una zona de montaña
- 2.1.- Ciclo global del Hg
- 2.2.- Ciclo del agua
- 2.3.- Transporte compartimental de Hg en un ecosistema acuático
- 2.4.- Ciclo del Hg en un sistema acuático. Distribución compartimental del Hg y MeHg
- 5.1.- Dinámica de los metales en el sistema suelo-planta
- 5.2.- Sección longitudinal del cariósido
- 5.2a.- Diluciones del metilmercurio
- 5.3.- Diagrama de dispersión de [MeHg] y no-germinación de *H. vulgare*
- 5.4.- Ajuste de la curva de regresión de [MeHg] sobre la no-germinación de *H. vulgare*
- 5.5.- Curva ROC de *H. vulgare*
- 5.6.- Altura media en relación a los factores [MeHg] y germinación de *H. vulgare*
- 5.7.- Altura media de la planta en relación al factor [MeHg] de *H. vulgare*
- 5.8.- Ajuste de la curva de regresión de [MeHg] sobre la altura media de las plantas de *H. vulgare*
- 5.9.- Diagrama de dispersión de [MeHg] y no-germinación de *Z. mays*
- 5.10.- Ajuste de la curva de regresión de [MeHg] sobre la no-germinación de *Z. mays*
- 5.11.- Curva ROC de *Z. mays*
- 5.12.- Altura media en relación a los factores [MeHg] y germinación de *Z. mays*
- 5.13.- Altura media de la planta en relación al factor [MeHg] de *Z. mays*
- 5.14.- Ajuste de la curva de regresión de [MeHg] sobre la altura media de las plantas de *Z. mays*
- 5.15.- Diagrama de dispersión de [MeHg] y no-germinación de *L. culinaris*
- 5.16.- Ajuste de la curva de regresión de [MeHg] sobre la no-germinación de *L. culinaris*
- 5.17.- Curva ROC de *L. culinaris*
- 5.18.- Altura media en relación a los factores [MeHg] y germinación de *L. culinaris*
- 5.19.- Altura media de la planta en relación al factor [MeHg] de *L. culinaris*
- 5.20.- Ajuste de la curva de regresión de [MeHg] sobre la altura media de las plantas de *L. culinaris*
- 5.21.- Diagrama de dispersión de [MeHg] y no-germinación de *V.faba*
- 5.22.- Ajuste de la curva de regresión de [MeHg] sobre la no-germinación de *V.faba*
- 5.23.- Curva ROC de *V.faba*
- 5.24.- Altura media de la planta en relación al factor [MeHg] de *V.faba*
- 5.2.- Ajuste de la curva de regresión de [MeHg] sobre la altura media de las plantas de *V.faba*

- 5.26.- Curva ROC de las cuatro especies botánicas
- 5.27.- Altura media de las plantas en relación a los grupos control y los factores especie botánica y [MeHg].
- 5.28.- Ajuste de las curvas de regresión de la [MeHg] sobre la altura media alcanzada por las diferentes especies botánicas.
- 6.1.- Especies representativas de zooplancton dulceacuícola
- 6.2.- Anatomía de cladócero
- 6.3.- Daphnia
- 6.4.- Daphnias
- 6.5.- Efipto
- 6.6.- Bosmina
- 6.7.- Bosmina
- 6.8.- Chidorus
- 6.9.- Chidorus
- 6.10.- Esquema de los tres tipos de copépodos hembra dulceacuícolas
- 6.11.- Anatomía de copépodo y Copépodo
- 6.12.- Copépodo ciclopoide con sacos ovígeros
- 6.13.- Copépodos ciclopoide con sacos ovígeros
- 6.14.- Copépodo calanoide
- 6.15.- Copépodos calanoides con sacos ovígeros
- 6.16.- Despiece de la cámara de separación fototáctica
- 6.17.- Principio de funcionamiento de la cámara de separación fototáctica
- 6.18.- Cámara de separación fototáctica
- 6.19.- Cámara de separación fototáctica
- 6.20.- Recogida de zooplancton de la cámara de separación fototáctica
- 6.21.- Distribución porcentual de la fototaxia y mortalidad en el zooplancton
- 6.22.- Porcentajes de fototaxia positiva y [MeHg] en el zooplancton
- 6.23.- Porcentajes de mortalidad y [MeHg] en el zooplancton
- 6.24.- Correlación entre los porcentajes de mortalidad y [MeHg] en el zooplancton
- 6.25.- Correlación entre los porcentajes de mortalidad y fototaxia en el zooplancton
- 7.1.- *S. stali* macho
- 7.2.- *S. stali* hembra
- 7.3.- Puerto de Navafría
- 7.4.- Puerto de la Morcuera
- 7.5.- *N. sylvestris*
- 7.6.- *N. sylvestris* macho
- 7.7.- *N. sylvestris* hembra

7.8.- Puerto de la Morcuera

7.9.- Puerto de Navafría

7.10.- Insectario

7.10b.- Sección transversal acotada de las jaulas de Ensifera

7.11.- Tiempo de vida (días) de *S. stali* en relación a la interacción [MeHg] y sexo

7.12.- Curvas de supervivencia en las diferentes [MeHg] durante 14 días de *S. stali*

7.13.- Regresión de [MeHg] sobre el tiempo medio de vida de *S. stali*

7.14.- Tiempo de vida de *N. sylvestris* en relación a estado y [MeHg] a los 21 días

7.15.- Curvas de supervivencia del control y de [250] a [1000] ppm de [MeHg] de *N. sylvestris*

7.16.- Curvas de supervivencia del control y de [1.9] a [200] ppm de [MeHg] de *N. sylvestris*

7.17.- Regresión de [MeHg] sobre el tiempo medio de vida de *N. sylvestris*

7.18.- Interacción entre tipo de ortóptero y [MeHg]

7.19.- Curvas de supervivencia de *N. sylvestris* a 14 días

7.20.- Curvas de supervivencia *S. stali* a 14 días

ÍNDICE DE TABLAS

1.I.- Pirámide trófica

3.I.- Tipos de bioindicadores

3.II.- Invertebrados utilizados en pruebas de medioambiente

3.III.- Estudios experimentales ecotoxicológicos

5.I.- Germinación y altura (mm) de *H. vulgare*

5.II.- Porcentaje de germinación y [MeHg] en *H. vulgare*

5.III.- Modelo regresivo de no-germinación de *H. vulgare*

5.IV.- Distribución de la altura media en relación a la germinación y [MeHg] de *H. vulgare*

5.V.- Comparaciones múltiples (Estadístico de Tahmane) de *H. vulgare*

5.VI.- Germinación y altura (mm) de *Z. mays*

5.VII.- Porcentaje de germinación y [MeHg] en *Z. mays*

5.VIII.- Modelo regresivo de no-germinación de *Z. mays*

5.IX.- Distribución de la altura media en relación a la germinación y [MeHg] de *Z. mays*

5.X.- Comparaciones múltiples (Estadístico de Tahmane) de *Z. mays*

5.XI.- Germinación y altura (mm) de *L. culinaris*

5.XII.- Porcentaje de germinación y [MeHg] en *L. culinaris*

5.XIII.- Modelo regresivo de no-germinación de *L. culinaris*

5.XIV.- Distribución de la altura media en relación a la germinación y [MeHg] de *L. culinaris*

5.XV.- Comparaciones múltiples (Estadístico de Tahmane) de *L. culinaris*

5.XVI.- Germinación y altura (mm) de *V. faba*

5.XVII.- Porcentaje de germinación y [MeHg] en *V. faba*

5.XVIII.- Modelo regresivo de no-germinación de *V. faba*

5.XIX.- Distribución de la altura media en relación a la germinación y [MeHg] *V. faba*

5.XX.- Comparaciones múltiples (Estadístico de Tahmane) de *V. faba*

5.XXI.- Distribución de las 2123 semillas en relación al tipo de especie botánica

5.XXII.- Porcentaje de germinación de las 2123 semillas

5.XXIII.- Modelo regresivo logístico de la no-germinación

5.XXIV.- Altura media de las plantas en relación a cada especie botánica

5.XXV.- Diferencias de altura en función de la especie botánica

5.XXVI.- Comparaciones múltiples de la altura de las 1506 plantas (Estadístico de Tahmane)

5.XXVII.- Visión global y simplista de la no-germinación de las semillas contaminadas con MeHg y no contaminadas

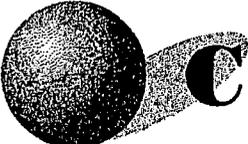
5.XXVIII.- Visión global y simplista del desarrollo en altura de de las semillas contaminadas con MeHg y no contaminadas

- 6.I.- Distribución numérica del zooplancton en relación a la fototaxia y mortalidad
- 6.II.-Diferencias entre porcentajes de fototaxia de las distintas [MeHg] (Significación de Bomferroni)
- 6.III.-Diferencias entre la mortalidad de las distintas [MeHg] (Significación de Bomferroni)
- 7.I.- Distribución por sexo de *S. stali* en las diferentes [MeHg]
- 7.II.- Tiempos totales de vida de *S. stali* en relación al sexo y [MeHg]
- 7.III.- Diferencias entre grupos (Estadístico de Tahmane)
- 7.IV.- Número de muertes registradas en el tiempo de estudio en relación a [MeHg]
- 7.V.- Riesgos relativos ajustados de Cox
- 7.VI.- Mortalidad de *N. sylvestris* en función de [MeHg]
- 7.VII.-Tiempos de vida de *N. sylvestris* en relación a [MeHg] a los 21 días
- 7.VIII.- Diferencias de tiempo medio de vida entre grupos (Estadístico de Tahmane)
- 7.IX.- Frecuencia de muertes en el tiempo
- 7.X- Riesgos relativos de Cox
- 7.XI- Distribución de muertes en un tiempo de 14 días
- 7.XII- Tiempos medios de vida en relación a [MeHg] y tipo de ortóptero
- 7.XIII- Análisis de riesgos ajustados

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	=	Altura de la planta (mm)
Ach	=	Acetil colina
APHA	=	American Public Health Association
ASTM	=	American Society for Testing and Materials
β	=	Coefficiente de regresión
BOE	=	Boletín Oficial del Estado
BHE	=	Barrera hematoencefálica
CAM	=	Comunidad Autónoma de Madrid
CEE	=	Comunidad Económica Europea
CSIC	=	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DI ₅₀	=	Dosis Inhibitoria media
DL ₅₀	=	Dosis Letal media.
DS	=	Desviación típica
EPA	=	Environmental Protection Agency
ES	=	Error típico
F	=	Valor estadístico de Snédecor
FAO	=	Food and Agriculture Organization of the United Nations
gl	=	Grados de libertad
GSH	=	Glutation.
Hg	=	Mercurio
IC	=	Intervalo de confianza
IG	=	Índice de germinación
Ig	=	Inhibición germinativa
ISTP	=	Ingesta Semanal Provisional Tolerable
IUCA	=	Instituto Universitario de Ciencias Ambientales
$\mu\text{g/L}$	=	Microgramos/Litro
ml/L	=	Miligramos/Litro
MeHg	=	Metilmercurio
[MeHg]	=	Concentración de metilmercurio en partes por millón
Mmol	=	Milimoles
msnm	=	metros sobre el nivel del mar
NG	=	No-germinación
NIOSH	=	National Institute for Occupational Safety and Health
NS	=	No significativo
OECD	=	Organization for Economic Development and Cooperation.

OMS	= Organización Mundial para la Salud
OR	= Odds-ratio
OR_{aj}	= Odds-ratio ajustados
p	= Probabilidad asociada al estadístico
p_c	= Probabilidad corregida de Bonferroni
PCBs	= Poli Cloro Bifenilos
ppm	= Partes por millón
r	= Coeficiente de correlación de Pearson
r²	= Coeficiente de determinación
ROC	= Receiver Operative Characteristic curve (Curva de rendimiento diagnóstico)
RR	= Riesgo relativo
RR_{aj}	= Riesgo relativo ajustado
SNC	= Sistema Nervioso Central
t	= Valor de Student
T	= Tiempo medio de vida
TAC	= Tasa Actual de Cambio
USEPA	= United States Environmental Protection Agency
UCM	= Universidad Complutense de Madrid
χ²	= chi-cuadrado
W	= Área bajo la curva ROC



CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN: PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

La motivación por la preservación de nuestro medio ambiente determina el objetivo de este trabajo sobre el estudio de posibles Bioindicadores y su aplicación como método alternativo en la Ecotoxicología, en orden de prevenir las alteraciones producidas por la presencia de polutantes o contaminantes y su repercusión en la degradación del medio ambiente y en la salud humana.

En la segunda mitad del siglo XX se ha producido un aumento del interés general por la contaminación ambiental y la salud pública.

La utilización excesiva de metales en todos los sectores industriales ha provocado un aumento de la bioconcentración basal de la mayor parte de estos elementos, rompiendo así sus ciclos bioquímicos naturales.

El impacto destructivo comenzó con la llegada de la revolución industrial que generó un sobreconsumo y malgasto de la producción. Ello ha conducido a un elevado número de tóxicos antropogénicos y llevado a una preocupante polución medioambiental de tierra, agua y aire.

Ante esta problemática, todos los países se han puesto de acuerdo para determinar los niveles máximos permisibles de los distintos polutantes como medida profiláctica de los trastornos que pueden originar.

Los estudios realizados evidencian que la existencia de polutantes pueden originar un cambio en el desarrollo y/o en la conducta de los animales y plantas pudiéndose utilizar estos seres vivos como bioindicadores de la presencia de estos compuestos

El uso de bioindicadores supone una solución alternativa al empleo de otros elementos de origen mecánico más sofisticado. Su utilización es sencilla, la fiabilidad alta y sus alteraciones ante la presencia de cambios en el entorno medioambiental son fácilmente cuantificables. Y, sobre todo, su coste económico es bajo, permitiendo un campo de investigación para que el licenciado intente rematar dignamente su carrera

académica, demostrando la capacidad de sacar rendimiento de los medios a su alcance, aún siendo menguados.

Es en el campo ecotoxicológico donde con más frecuencia se utilizan dichos indicadores biológicos en la detección de perturbaciones de los ecosistemas ya que, además, indican la situación o carga tóxica de dicho medio ambiente, incluso precozmente si se utilizan especies muy sensibles.

1.1. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

En este trabajo se aborda la posibilidad de utilizar algunos organismos (posibles bioindicadores) botánicos y animales habituales en la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) que indiquen la existencia de contaminación medioambiental por metales pesados, centrando la investigación en el metilmercurio (MeHg).

El MeHg es un tóxico medioambiental que induce degeneraciones neurológicas severas en los animales y en el hombre. Su problemática deriva de las peculiaridades bioacumulativas del metal ya que, una vez incorporado al medio ambiente, su concentración se incrementa a medida que se asciende en la pirámide alimentaria. Las concentraciones en algas marinas son unas cien veces superiores a las de aguas y, a su vez, los peces presentan concentraciones superiores a las de las algas. Las aves salvajes sufren los efectos del mercurio al consumir vegetales tratados con antifúngicos, así como los peces y mamíferos en los que, por mecanismo directo (contacto) o indirecto (predación), se detectan progresivamente mayores concentraciones del tóxico.

Para el estudio de la bioindicación tóxica medioambiental hemos optado por utilizar organismos pequeños, autóctonos, de corto período de vida y representativos de las diferentes cotas de altitud de la CAM.

El primer paso en la planificación de un estudio es definir claramente sus objetivos. En el presente trabajo los **objetivos** diana de la investigación son los siguientes:

1. Revisión y actualización bibliográfica del material biológico a experimentar y del MeHg.
2. Diseño de una tecnología adecuada para la realización del experimento.
3. Utilización de animales y plantas autóctonos para establecer su

potencialidad ecotoxicológica bioindicadora y/o biomedidora.

4. Creación de una base de datos que integre toda la información recogida a lo largo del proyecto sobre la que aplicar posteriormente la metodología bioestadística, determinando el grado de fiabilidad de los parámetros aplicados en la detección medioambiental del efecto tóxico.
5. Establecimiento, en caso positivo, de las calidades de bioindicación y bioimediación de las muestras empleadas.

1.2. DISEÑO DE TRABAJO

El plan de trabajo se ha enfocado fundamentándolo en las peculiaridades del ciclo del agua, por la capacidad reservoria y motora de los contaminantes medioambientales del elemento y cuyo esquema dinámico se expone con detalle en el capítulo 2.

Los metales pesados afectan peligrosamente a la calidad de las aguas y, por tanto, a los ecosistemas. Su detección precoz puede evitar el desastre de la intoxicación masiva, consecuente a la contaminación de alimentos. Por ello es importante la búsqueda e identificación de organismos de respuesta inmediata ante cualquier cambio ambiental producido por tales tóxicos. El MeHg como metal contaminante, tiene una gran dispersión en el agua y llega a los estuarios a través de las aguas continentales, por vía fluvial y procedente de vertidos contaminando el ciclo y a los ecosistemas mediante el arrastre de compuestos metilmercuriales tóxicos y también por disolución.

Es por ello que el presente trabajo se inicia con una exposición histórica, teórica y actualizada sobre el MeHg fundamentada en la oportuna revisión bibliográfica.

La detección y vigilancia de estos contaminantes ambientales supone la utilización de tecnología analítica sofisticada, costosa y muy especializada. La posibilidad de utilizar organismos sencillos que, a modo de **bioindicadores** y/o **biomedidores** detecten la contaminación tóxica medioambiental, sirviendo como **biomonitores**, permitiría un sistema de monitorización económico, ecológico, sensible y de funcionamiento continuo. Esta hipótesis justificaría cualquier esfuerzo investigador en tal sentido y ha sido decisiva en la puesta en marcha del presente estudio. Dentro de la cadena hidrológica nos hemos centrado en la parte de aguas continentales, por ser la que más atañe a nuestro propio ciclo vital. No es objeto del presente estudio aquello referente

a las aguas marinas que ya han sido ampliamente estudiadas por diversos investigadores. Un tercer capítulo de este trabajo, expone el conocimiento conceptual y aplicativo sobre aquellos aspectos de la bioindicación que conciernen a la protección medioambiental y da paso a la parte experimental en la que se analizan y evalúan los posibles comportamientos bioindicadores de las especies analizadas.

Entre los múltiples organismos que se podían utilizar en este estudio, se eligen aquellos que mejor representan los ecosistemas terrestres y acuáticos relacionados, tanto con la alimentación veterinaria como humana, con una gran relación en la pirámide trófica (Tabla 1.1) y de gran interés económico, agrícola y ganadero.

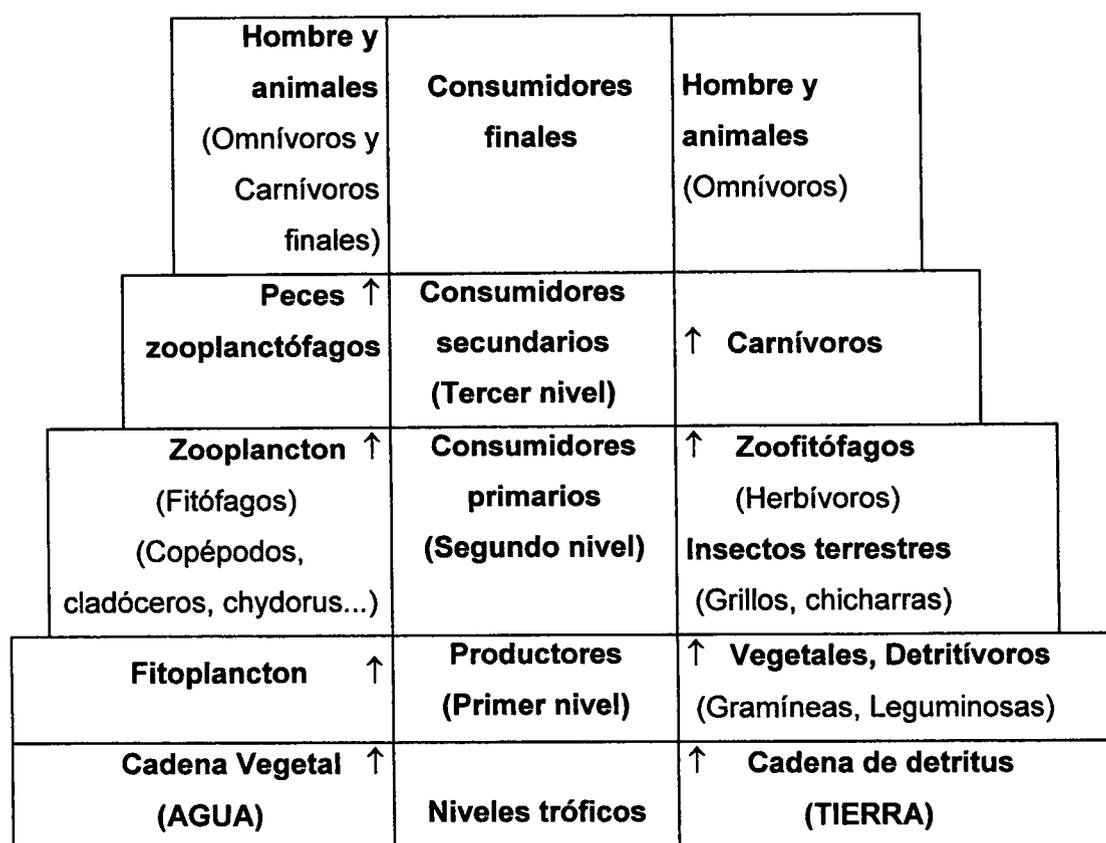
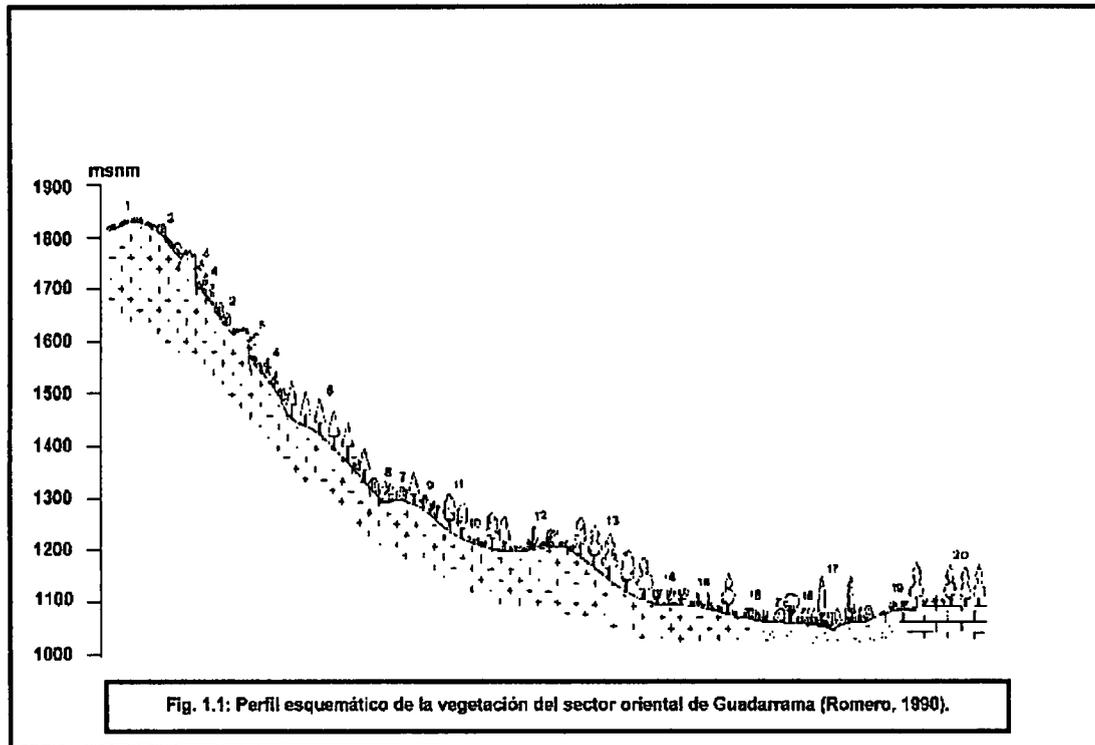


Tabla 1.1: Pirámide trófica

Se ha considerado asimismo que, cumpliendo las recomendaciones APHA (American Public Health Association) y por razones prácticas, las especies seleccionadas debían ser abundantes, frecuentes y de fácil manejo y, desde el aspecto bioético, cumplir con la premisa de no estar catalogadas como especies protegidas.

Para la selección de las especies y dentro de éste ciclo biológico, se monitorizan cinco puntos de una zona de montaña y que se detallan en el esquema de la Fig. 1.1 que asimismo muestra la vegetación potencial que se puede encontrar en las cotas (Fig. 1.2).



- | | |
|--|---|
| 1.- Pastos psicroxerófilos (<i>Minuartio-Festucion indigestae</i>) | 11.- Melojares (<i>Luzulo-Quercetum pyrenaicae</i>) |
| 2.- Piornales (<i>Junipero-Cytisetum purgantis</i>) | 12.- Com. saxicolos de <i>Rumici-Dianthion lusitani</i> |
| 3.- Comunidades rupicolos de <i>Saxifragion caballeroi</i> | 13.- Bosque mixto de sabinas y melojos |
| 4.- Com. saxicolos de <i>Dryopteridion oreadis</i> | 14.- Jarales de <i>Cistion laurifolii</i> |
| 5.- Com. rupicolos de <i>Saxifragion continentalis</i> | 15.- Pastos vivaces de <i>Hieracio-Plantaginion</i> |
| 6.- Pinar de <i>Pinus sylvestris</i> | 16.- Cultivos |
| 7.- Espinares (<i>Pruno-Rubion ulmifolii</i>) | 17.- Bosques riparios |
| 8.- Saucedas de <i>Salicion salvifoliae</i> | 18.- Prados de siega (<i>Arrhenatheretalia</i>) |
| 9.- Escobonares de <i>Genistion floridae</i> | 19.- Tomillares de <i>Aphyllanthion</i> |
| 10.- Pastos terofíticos de <i>Trisetio-Agrostion truncatulae</i> | 20.- Sabinares (<i>Juniperetum hemisphaericothurif</i>) |

- **Punto uno:** Es una zona de alta montaña en donde la flora existente es de prado alpino, matorral y coníferas; de mayor índice pluviométrico, con predominio de precipitaciones en forma de nieve. Debido a sus condiciones climáticas, no existen cultivos y su aprovechamiento principal es como área ganadera en los pastos de altura. Según el esquema de la Fig. 1.1, abarcaría la zona comprendida desde los Piornales (Nº 2) hasta las Saucedas (Nº 8). El organismo elegido para representar este punto ha sido el artrópodo terrestre *Steropleurus stali* (chicharra), especie típica de zona boreal, de ubicación endémica en la sierra de Madrid y moradora en la retama de alta montaña. Las capturas se realizaron en un rango de altitud de 1400-1800 m.



Fig. 1.2: Monitorización de cinco cotas de la Sierra de Guadarrama (CAM)

- **Punto dos:** Es el bosque de caducifolios, donde existe gran cantidad de agua estacionada que va a parar a los acuíferos. A este nivel, tampoco existen cultivos, pero si puede haber pastizales y ganadería. Según el esquema de la Fig. 1.1, abarcaría desde los Escobonares (Nº 9) hasta los Jarales (Nº 14). Como representante de este

punto se ha elegido el artrópodo terrestre *Nemobius sylvestris* (grillo) habitante de un bosque caducifolio donde se genera un suelo de características especiales, que vive perfectamente entre una hojarasca de roble con notable y sostenida capacidad higroscópica y con querencia por el agua estacionada en su discurrir hacia los acuíferos. Los ejemplares se capturaron en un rango de altitud de 800-1300 m.

El uso de los vegetales predominantes como indicadores de ambas zonas no se ha estimado porque presentan una gran dificultad de manipulación si no se dispone, como en este caso, de laboratorio dotado con cámara climática al ser especies de crecimiento tardío y muy lento. Otra razón selectiva es que, para el estudio de las zonas altas, húmedas y de menor contaminación, es preferible la experimentación con animales ya que tienden a concentrar más el tóxico.

•**Punto tres:** Es la zona llana, a pie de sierra, la que existe en el tramo medio del río. La precipitación es menor y la mayor parte del agua viene de la montaña, almacenándose en embalses. El agua de esta zona se utiliza tanto para beber como para regar, siendo obligatorio su control de calidad. Como especie representativa de la zona se ha elegido su zooplancton, compuesto principalmente por artrópodos, entre ellos *Cyclops*, *Bosmina*, *Daphnia* y *Chydorus*. El zooplancton conforma el primer eslabón de la cadena alimentaria de los peces y acredita una respuesta extremadamente bien desarrollada hacia el estímulo lumínico (fototropismo positivo) y muy tentadora para el investigador.

•**Puntos cuatro y cinco:** Es la zona baja en la que existen cultivos (a partir de la zona Nº 16). Estos se pueden categorizar en cultivos pluvio-dependientes, tipo gramíneas y aquellos que dependen importantemente del riego, como son los de leguminosas. Se han seleccionado plantas comunes y de importancia nutricional tanto en alimentación humana como en la de animales domésticos. De los pluvio-dependientes se han utilizado *Hordeum vulgare* (cebada) y *Zea mays* (maíz) y de los riego-dependientes *Lens culinaris* (lenteja) y *Vicia faba* (haba).

Seleccionadas las especies, se inicia la experimentación botánica, mediante siembra de las gramíneas que se cultivan en las regiones áridas esteparias y en los pastos y prados que quedan por encima de la línea del bosque de montaña. Se continuó el estudio con las leguminosas. En ambas se analiza la germinación de las semillas y el desarrollo del tallo de las plántulas en relación con las distintas concentraciones tóxicas.

En un segundo estadio, se continua la experimentación con artrópodos acuáticos (Zooplankton) de embalses serranos, en los que se estudia su fototaxia y mortalidad en relación con las distintas concentraciones del tóxico.

Por último, y tras el trabajo de campo que supone las capturas de animales, se continua la experimentación mediante la realización de bioensayos en artrópodos terrestres. Primero con *Steropleurus stali*, para posteriormente experimentar con *Nemobius sylvestris*. En ambos se ha estudiado su mortalidad en relación con las distintas concentraciones del MeHg.

Dado el número y diversidad de las especies estudiadas, para detallar la metodología específica y en el intento de mejorar la legibilidad y facilitar la comprensión, se presentan los resultados en formato de capítulos específicos.

Desde la humildad, hasta donde llega nuestro conocimiento y tras una muy laboriosa búsqueda informativa de las fuentes a nuestro alcance, no se ha podido constatar que los enfoques experimentales que se presentan, pese a la aparente sencillez de diseño que impone la escasa dotación de medios de la Sección de Biología y Sanidad del Instituto Universitario de Ciencias Ambientales (IUCA) de la UCM, haya sido abordado anteriormente. La inexistencia de otras referencias experimentales similares para el contraste científico, ha sido una razón más que suficiente para procesar los resultados de este estudio con una muy exigente metodología bioestadística en la que se han aplicado los conceptos más avanzados para la detección y análisis de los bio-riesgos, abriendo un campo de investigación para que el licenciado intente rematar dignamente su carrera académica demostrando la capacidad de sacar rendimiento de los medios a su alcance aún siendo menguados.

1.3. REFERENCIAS

1. Romero Martín T. El Paisaje de la Cuenca del Duratón. III Jornadas sobre el paisaje. Segovia. 1990; 409 pp.

CAPÍTULO 2



BIBLIOTECA

2. ECOTOXICOLOGÍA DEL MERCURIO

2.1. INTRODUCCIÓN

Desde la perspectiva toxicológica, el mercurio (Hg) es un polutante penetrante de alta toxicidad que se acumula en el organismo, principalmente de los peces, siendo en consecuencia uno de los elementos traza más estudiado del medio ambiente.

El Hg es uno de los primeros metales nobles utilizados por el hombre debido a las propiedades curativas de algunos de sus compuestos. Desde 1495 se aplicaron tratamientos contra la sífilis con compuestos de ese metal. Su toxicidad también es conocida desde antiguo. Los griegos en el año 3.000 a. C., obtenían Hg principalmente de las menas de cinabrio (alfa-HgS) para medicamentos y ceremonias religiosas. Los romanos importaban cantidades considerables de cinabrio, debido a su intenso color rojo, para fabricar el pigmento bermellón con el que decoraban sus casas y para cosméticos. Se citan intoxicaciones entre los mineros de Almadén de la Plata en tiempos de los romanos y se calcula que en el año 77 a. C., éstos importaban anualmente de España aproximadamente 5.000 kg de Hg.

Woodall, cirujano inglés, en 1639 se refería al Hg en su trabajo "The surgeon's mate or military & domestic surgery", en los siguientes términos: "*...el más cálido, el más frío, un verdadero cicatrizante, un cruel asesino, una preciada medicina y un veneno mortal, un amigo que puede adular y mentir...*".

De forma cronológica se puede decir que hasta principios de siglo la mayoría de las intoxicaciones crónicas eran debidas a la absorción de vapor de Hg o de sus sales inorgánicas. La introducción de compuestos orgánicos sintetizados en 1863, como fungicidas fundamentalmente, ha originado numerosos casos de intoxicación crónica y aguda (Soria & Repetto, 1995).

Todos los compuestos de Hg son venenosos, en particular los solubles en grasa (metil-mercuriales) y los solubles en agua (sales de Hg).

La importancia ecotoxicológica del Hg y del resto de metales como agentes contaminantes se refleja en su inclusión en la lista elaborada en 1977 por la *Environmental Protection Agency* (EPA) de EEUU que recoge los productos químicos sujetos a vigilancia de la "*Toxic Substances Control Acts*". Las sustancias que se incluyen en dicha lista se seleccionaron en base a su peligrosidad para la salud humana. Los metales recogidos son: Ag, As, Be, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb, Sb, Ti, y Zn (Munro et al., 1981; Seiber, 1990).

El Hg y sus componentes, están contemplados jurídicamente como Residuos Tóxicos y Peligrosos. Su definición, gestión, régimen jurídico, etc., vienen definidos en la correspondiente Ley 20/1986 de 14 de Mayo de 1986 (Jefatura de Estado), y en el Real Decreto 833/1988, de 20 de Julio, por el que se aprueba el Reglamento para la ejecución de dicha Ley.

La definición de Residuos Tóxicos y Peligrosos según la citada Ley es la siguiente:

"Los materiales sólidos, pastosos, líquidos, así como gaseosos contenidos en recipientes, que siendo el resultado de un proceso de producción, transformación, utilización o consumo, su productor destine al abandono y contengan en su composición alguna de las sustancias y materias que figuran en el Anexo de la presente Ley en cantidades o concentraciones tales que representen un riesgo para salud humana, recursos naturales y medio ambiente".

Existen microorganismos (*Clostridium* sp.) capaces de transformar las sales mercuriales en metales mercuriales o compuestos de metilmercurio (MeHg) (Bertram et al., 1984).

Los compuestos de Hg han sido responsables de numerosas intoxicaciones masivas debido a su presencia como contaminantes de alimentos.

En el año 1953, se produjo la más trágica contaminación acuática por MeHg en la Bahía de Minamata en el mar de Yatsushiro (Japón), que dio lugar a una enfermedad neurológica desconocida que afectó extensamente a la población. Los síntomas consistían en debilidad muscular progresiva, pérdida de la visión, deterioro de las actividades cerebrales y una eventual parálisis que, en muchos casos, acabó en coma y muerte. En 1959 se descubrió que la causa de esta enfermedad, conocida como "la enfermedad de Minamata", estaba producida por el consumo de pescado y mariscos

contaminados con MeHg. Posteriormente se descubrió que el Hg procedía de una planta industrial de compuestos de vinilo y acetaldehído, cuyo reactor contenía un catalizador con un 1% del metal. Afectó a 169 casos registrados sobre más de 1200 estimados.

Casos semejantes de intoxicación por consumo de pescado contaminado con Hg, han sido identificados en las ciudades japonesas de Nigata, en los años 1964-65 y en Goshonoura en 1973.

La grave intoxicación por contaminación con Hg que ocurrió en Irak en 1971-1972 (Smith et al., 1976; Al-Mufti et al., 1976; Al-Tikriti, 1976), fue debida al consumo de harina de trigo cuyo grano había sido tratado previamente con el fungicida etilmercurio-P-toluensulfamida. Se han repetido intoxicaciones de igual etiología al consumir granos destinados a la siembra y usados para alimentación, como en el caso de Paquistán, donde se contabilizaron 34 muertos intoxicados por trigo tratado con etilmercurio y acetato de MeHg.

En Nuevo México en 1969, se intoxicaron nueve miembros de una familia por el consumo de carne de cerdo que habían sido alimentados con grano tratado con MeHg.

En 1980, en Buenos Aires, Argentina, de 12000 bebés que habían estado expuestos a un fungicida con el que se habían desinfectado comercialmente los pañales y que contenía fenilmercurio, 1600 de ellos presentaron sintomatología (diarrea, erupciones y úlceras abiertas) (Pierce, 1972; Snyder, 1971).

Ese mismo año en Managua, apareció un envenenamiento masivo por Hg que afectó neurológicamente a 56 de los 152 trabajadores de una planta industrial (Seyffart, 1997).

Los investigadores de Greenpeace han documentado una contaminación mercurial en Natal Province, Sudáfrica, encontrando niveles sedimentarios tan elevados como 1760 ppm en áreas poblacionales corriente abajo procedentes de la mayor factoría procesadora de Hg de tratamiento de los desperdicios procedentes de las industrias farmacéuticas y químicas de EEUU y otros países (Christrup, 1990).

La polución mercurial de la cadena alimentaria es una de las consecuencias del ímpetu por la búsqueda de oro en la Amazonia (Bioschio-Hendhel, 1996). Desde finales de 1970 muchos ríos de su floresta, han sido explorados para la extracción de oro utilizando el Hg como amalgamador para separar las partículas finas de oro de las areniscas al formar un complejo Au-Hg (Grandjean et al., 1999). Durante este proceso,

parte del Hg (5-30%) se descarga directamente en el río. En la recuperación final del oro, que se hace principalmente quemando la amalgama, se liberan cantidades considerables de Hg a la atmósfera (aproximadamente un 20%). Por cada kilo de oro, son liberados en el medio ambiente 1,32 kg. aproximadamente de Hg. Se ha calculado que anualmente se liberan al medio ambiente entre 90 y 120 toneladas de Hg. Esto es un indicativo de la magnitud de los problemas de salud en los mineros y residentes locales y de la enorme contaminación de Hg que está afectando al Amazonas.

Casi todo el Hg utilizado por el hombre pasa finalmente al ambiente y el gran problema generado radica en que, una vez incorporado al medio, la tasa de dicho metal va incrementándose en la escala zoológica. Las concentraciones en algas marinas son unas cien veces superiores a las de las aguas, y los peces presentan concentraciones superiores a las de las algas marinas. Las aves salvajes también sufren los efectos del Hg al consumir vegetales tratados con antifúngicos y los pescados y mamíferos van alcanzando cada vez mayor concentración de compuestos mercuriales (Soria et al., 1995). Hay una circunstancia peculiar, la del lirio de agua que, al crecer más que de ordinario en presencia de Hg, sirve como indicador de contenido mercurial en las aguas de desagües industriales.

Al evaluar el riesgo del Hg en un ambiente determinado no es suficiente conocer la forma de penetración en el ambiente ya que tras ella pueden tener lugar varias transformaciones. Probablemente, la más grave de éstas es el paso del Hg metálico a metil y dimetil-derivados por acción de microorganismos anaeróbicos en los sedimentos acuáticos, especialmente *Clostridium cochlearium*. Esto puede producirse en los peces en descomposición. En condiciones aeróbicas estas transformaciones pueden realizarlas la *Pseudomonas* spp. y el hongo *Neurospora crassa*. En esencia, el proceso supone la conversión de la forma menos tóxica del Hg a la más tóxica. Otras transformaciones que pueden ser llevadas a cabo por las bacterias son las siguientes: los fenil, etil y MeHg pueden reducirse a Hg elemental y benceno, etano y metano, respectivamente; el acetato fenil-mercúrico puede convertirse aeróbicamente en Hg elemental.

No todas las transformaciones observadas son biológicas. En condiciones alcalinas, el MeHg se convierte en dimetilmercurio, que es más volátil. En condiciones oxidantes y en presencia de luz ultravioleta, el fenilmercurio, el alcoxilmercurio y el alquilmercurio pueden degradarse dando Hg inorgánico, pobremente soluble. Con la aireación subsiguiente, el sulfuro mercúrico puede convertirse en el sulfato soluble, el cual puede experimentar metilación biológica (Duffus, 1991).

Los desastres en Minamata en los años 50 y en Iraq en 1971-1972 han demostrado claramente los efectos neurológicos asociados con la ingestión de MeHg en adultos y en prenatales (Ratcliffe et al., 1996).

La intoxicación aguda por Hg provoca colapso cardiovascular, insuficiencia renal aguda y lesiones gastrointestinales. Los valores de DL_{50} son de 10-40 mg/kg de peso corporal para los compuestos de Hg^{2+} o para los organomercuriales. Según sea la dosis y el tiempo de exposición se pueden producir lesiones reversibles o irreversibles. Se pueden diferenciar los compuestos inorgánicos de Hg, que generalmente sólo producen lesiones reversibles, de los compuestos organomercuriales que suelen producir lesiones irreversibles, alteraciones morfológicas en el cerebro llamadas "lesiones silenciosas".

Los síntomas de la intoxicación subaguda por el vapor de Hg son: irritabilidad, pérdida de memoria, temblores y gingivitis, siendo necesario para llegar a este estado que la concentración atmosférica sea superior a $0,1 \text{ mg/m}^3$. Los síntomas de la intoxicación por MeHg son: parestesias, reducción del campo visual, dificultad auditiva y ataxia. Además, en los dos casos se producen lesiones renales.

Los iones Hg^{2+} interaccionan con las membranas celulares y cambian su permeabilidad, siendo mucho mayores los efectos de los organomercuriales que los de los iones Hg^{2+} . Se ha demostrado que los cloruros de alquilmércurio (R-HgCl) interaccionan con monocapas de fosfolípidos según su lipofilia. El efecto de la absorción del Hg por las proteínas se debe aparentemente a su unión con el grupo -SH de un resto de cisteína de la proteína. Ejemplos de enzimas cuya actividad es inhibida por el Hg son la fosfatasa alcalina, fosfohidrolasa ácida, glucosa 6-fosfatasa, láctico deshidrogenasa y glutaminasa.

2.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

El Hg es un metal blanco plateado, líquido a temperatura ambiente y el único conocido en estado líquido a 0°C . Junto con el cadmio y el cinc, se ubica en el grupo IIb de la tabla periódica. Su estructura cortical externa es $5d^{10}, 6s^2$.

Sus características físico-químicas son las siguientes:

- Número atómico: 80
- Peso atómico: 200.61
- Punto de fusión: -38.9°C
- Punto de ebullición: 356.9°C

- Densidad (20° C): 13.5955

- Tensión superficial: 480.3 din/cm³

A temperatura ambiente conduce mal la corriente eléctrica, pero se convierte en un excelente conductor en las proximidades del cero absoluto (superconductor). A elevada temperatura, en estado de vapor, conduce la electricidad (lámpara de vapor de Hg, rica en rayos ultravioleta).

Su coeficiente de dilatación térmica es prácticamente uniforme entre 0° C y 300° C por lo que se utiliza en la construcción de termómetros. Por su elevada densidad y baja presión de vapor se usa también en barómetros y bombas de vacío.

Disuelve numerosos metales con formación de amalgamas; sin embargo, no lo hace con el hierro por lo que se comercializa y conserva en frascos de ese metal.

El valor del potencial del sistema $\text{Hg}_2^{2+}/2\text{Hg}$ es bastante elevado en medio ácido ($E^0 = 0.79 \text{ V}$) lo que confiere al elemento ciertas características de metal noble. No es atacado por los ácidos no oxidantes, excepto por el ácido yodhídrico concentrado en el que se disuelve (Burriel et al., 1983).

Se combina con el azufre y halógenos, pero es realmente inerte excepto frente al ácido nítrico que es su mejor disolvente, tanto diluido como concentrado; también es soluble en ácido sulfúrico, pero sólo concentrado y en caliente.

Su solubilidad en agua es de 0.035 mg/L a 25° C. A 20° C se evapora de las gotas a un valor de 5.8 µg/hora/cm³. El aire saturado contiene 13 mg/m³, esto supone un nivel de Hg 360 veces superior a la concentración media permisible, de 0.05 mg/m³, recomendada para la exposición ocupacional por los Institutos Nacionales de Seguridad y Salud, EEUU (NIOSH, 1977).

Además de su estado elemental, el Hg existe en los estados de oxidación +1 (Hg I) y +2 (Hg II) en los que el átomo de Hg ha perdido uno y dos electrones, respectivamente.

Los compuestos de Hg son siempre divalentes, pero la tendencia del Hg es utilizar electrones de valencia para covalencias, así la unión del Hg mercurico (Hg^{2+}) a átomos de Hg (Hg^0) forma el mercurio mercurioso (Hg_2^{2+}) (Magos, 1988).

Además de las sales inorgánicas, como cloruros, nitratos y sulfatos, el Hg

(II) origina una clase importante de compuestos organometálicos que se caracterizan por el enlace del elemento a uno o dos átomos de carbono para formar compuestos del tipo RHgX y RHgR' donde R y R' representan el componente orgánico. Los compuestos más numerosos son los del tipo RHgX en los que X puede ser cualquier anión.

El enlace C-Hg es químicamente estable. No se rompe en agua, ni por acción de ácidos o bases libres. Esta estabilidad no se debe a una gran potencia del enlace (sólo de 15-20 cal/mol) sino a la bajísima afinidad del Hg por el oxígeno (WHO, 1976).

2.3. CICLO GLOBAL DEL MERCURIO

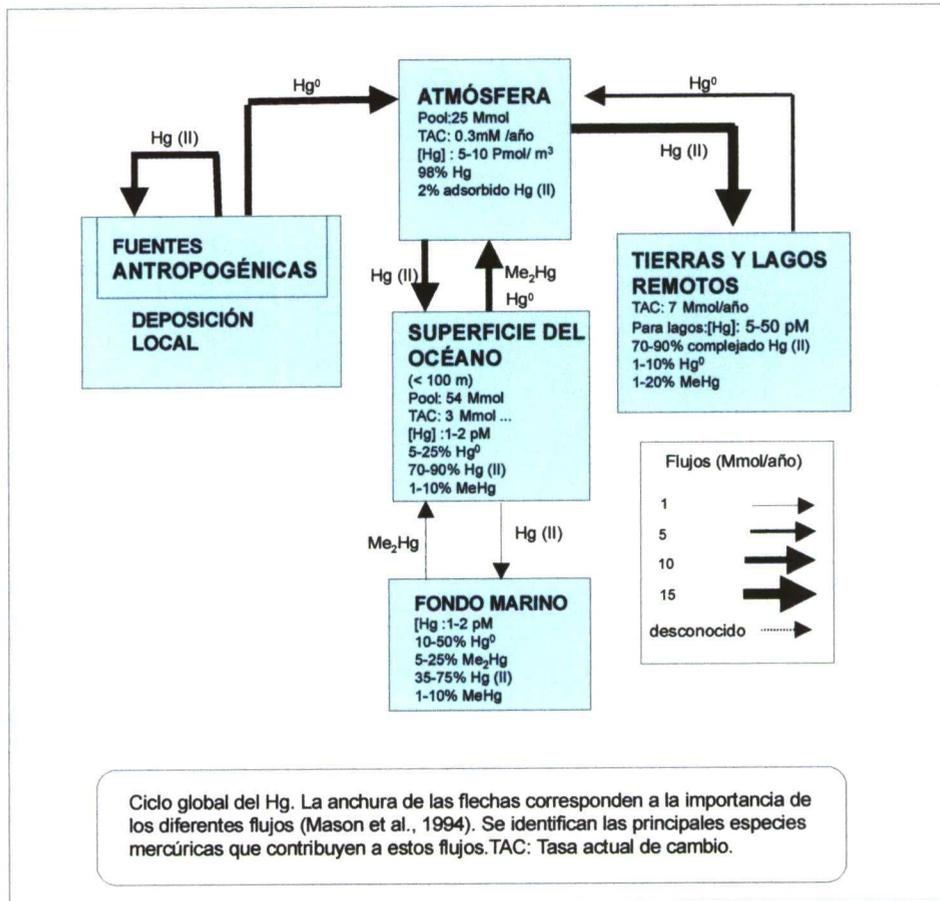
El único metal líquido a temperatura ambiente, el mercurio elemental Hg^0 es también un gas Hg^0 , con poca tendencia a disolverse en agua (Onat, 1974; Sanemasa, 1975). Habitualmente, las aguas naturales están supersaturadas de Hg^0 cuando se comparan con el aire que tienen encima y así, de la volatilización se genera un flujo de Hg^0 desde el agua hacia la atmósfera (Fig. 2.1). Esta supersaturación es máxima en los días de verano, cuando alcanza su máximo la fotorreducción de Hg(II) en aguas superficiales (Amyot et al., 1997a; Amyot et al., 1997b; Amyot et al., 1997c; Schroeder et al., 1992).

En la atmósfera, donde aproximadamente el 95% del mercurio total está en estado elemental, Hg^0 , es oxidado lentamente al estado de mercurio (+II), Hg(II) . La mayor parte de esta oxidación tiene lugar en la interfase sólido-líquido de las gotas de niebla y nubes. Probablemente el ozono es el principal oxidante de estos procesos, aunque también participan significativamente el HClO , HSO_3^- y OH^- (Munthe, 1992 y 1991). Las reacciones de oxidación del Hg^0 en la fase de gas por el O_3 , Cl_2 y H_2O_2 , a veces pueden ser importantes, aunque existen dudas en relación a sus tasas (Seigneur et al., 1994). Parte del Hg(II) producido en la atmósfera es re-reducido por mecanismos que implican o al SO^3 como reductante (Munthe, 1991) o a la fotorreducción del Hg(OH)_2 .

El retorno del mercurio desde la atmósfera hacia la superficie de la tierra ocurre principalmente por la vía de la precipitación húmeda del Hg(II) disuelto. La absorción del mercurio en aerosoles tales como el hollín también favorece su deposición, especialmente sobre la tierra (Mason, 1994), donde abundan los aerosoles. Como el Hg^0 se reoxida relativamente de forma más lenta al estado mercúrico Hg(II) , su tiempo de estancia en la atmósfera viene a ser de un año (Fitzgerald, 1997) o quizás menos. Este tiempo es suficiente para que el mercurio atmosférico se distribuya sobre la totalidad del planeta antes

de volver a la tierra, mar y hielo. En resumen, mientras que las emisiones principales de mercurio vienen de fuentes puntuales de concentración en las regiones industriales, realmente la polución por mercurio es total, afectando a las áreas más remotas del planeta (Fig. 2.1). Los estudios históricos de los sedimentos de los lagos proporcionan suficiente evidencia de que las áreas remotas reciben aportes significativos de mercurio antropogénico por transporte atmosférico de largo recorrido (Fitzgerald, 1998).

Una vez oxidado, el 60% del mercurio atmosférico se deposita en la tierra y el 40% en el agua, a pesar de que la tierra representa solamente el 30% de la superficie terráquea. La mayor proporción de depósitos de mercurio en la tierra viene condicionada presumiblemente por la proximidad de sus fuentes dado que la precipitación de agua sobre la tierra es tres veces menor que sobre los océanos. En las aguas oceánicas, tras ser sometido a una serie compleja de reacciones químicas y biológicas, la mayoría del Hg II se reduce a Hg⁰ y vuelve a la atmósfera. Sólo una pequeña fracción se exporta permanentemente a los sedimentos (Mason, 1994). Así, el pool de Hg en la atmósfera y en la superficie del agua de mar están íntimamente relacionados por un ciclo eficaz de precipitación/volatilización dirigido por reacciones de oxidación/reducción. En los lagos, los mecanismos principales de pérdida de Hg son la sedimentación y la evasión gaseosa. La importancia relativa de cada uno de estos componentes es objeto de polémica y parece estar en función de la concentración de Hg reducible en el epilimnion (Fitzgerald, 1994). En la tierra ocurre un proceso similar, condicionando un retorno menor de mercurio reducido a la atmósfera y un mayor depósito permanente en las tierras. En el caso de tierras no contaminadas, se observa algunas veces una deposición mercurial neta de tiempo seco (deposición seca > que la evasión de gas), aproximadamente tres veces menos frecuente que la emisión neta (deposición seca < que la evasión de gas) (Lindberg et al., 1995). Sin embargo, los lugares contaminados generan unos flujos importantes de emisión neta (Gustin et al, 1996; Lindberg et al., 1995). El transporte de mercurio por los ríos es pequeño en comparación con el flujo atmosférico.



Las fuentes antropogénicas de mercurio provienen de la producción de metales, cloroálcalis e industrias de pasta, desperdicios de manufacturas y tratamientos de desechos industriales y combustión de carbón, turba y madera (Lindqvist et al., 1991). Las emisiones naturales a la atmósfera, vienen de partículas de polvo de degasificación y entrada de aire desde la tierra, principalmente de áreas mercuríficas, erupciones volcánicas, incendios forestales, emisiones biogénicas de compuestos volátiles y de partículas y de degasificación de las superficies del agua (Rasmussen, 1994). De estas fuentes, la degasificación de las formaciones geológicas naturales ricas en mercurio ha sido minusvalorada en el pasado (Gustin et al., 1996; Gustin et al., 1997; Rasmussen, 1994). Fundamentándose en los estudios de sedimentos de los lagos, se cree que los aportes atmosféricos de mercurio se han triplicado en relación a los 150 años anteriores (Mason et al., 1994), lo que indica que dos terceras partes del mercurio que existe actualmente en la atmósfera y por tanto en la superficie del mar, es de origen antropogénico, siendo un tercio de origen natural (Fig. 2.1).

La Fig. 2.1 sintetiza el ciclo global del mercurio. La anchura de las flechas se corresponde con la importancia de los diferentes flujos estimados por Mason et al. (1994).

Se identifican las diferentes formas de Hg que contribuyen a estos flujos. La tasa actual de cambio (TAC), establece la relación de los reservorios globales (Hudson et al., 1995). Las concentraciones y distribuciones de las diferentes formas de mercurio son las medias de las distintas fuentes, particularmente de Fitzgerald & Mason (1997) y de Meili (1997).

2.4. BIOMAGNIFICACIÓN DEL MERCURIO EN LA CADENA ALIMENTARIA

Para que se produzcan concentraciones altas de Hg en los peces, además de ser consumido eficazmente por los microorganismos inferiores de la cadena alimentaria, también tiene que ser retenido por estos organismos y pasar a sus predadores. Muchos metales traza son acumulados eficientemente en las bacterias planctónicas y microalgas pero la mayoría no son magnificadas, es decir, sus concentraciones en la biomasa no aumentan (a menudo disminuyen) a niveles más altos en la cadena alimentaria.

Tanto el Hg(II) como el MeHg son retenidos eficientemente por los microorganismos, pero se demuestra experimentalmente que, sin embargo, la eficacia de la transferencia entre una diatomea marina y un copépodo es cuatro veces superior para el MeHg que para el Hg(II). Esto se explica porque el Hg(II) se une principalmente a las membranas celulares de las diatomeas que son excretadas más que absorbidas por el copépodo, mientras que el MeHg se asocia con la fracción soluble de la diatomea y es eficazmente asimilada por el copépodo (Mason et al., 1996). Los datos de campo indican que esta diferencia en la eficacia de la transferencia entre el Hg(II) y el MeHg es aplicable a otros microorganismos unicelulares y a sus predadores (Watras & Bloom, 1992). Para cuantificar la diferencia en la bioacumulación de mercurio orgánico e inorgánico en los primeros pasos de la cadena alimentaria hay que tener en cuenta tres factores: la concentración relativa de Hg(II) y MeHg, la proporción de cada uno en forma lípido-permeable (HgCl_2 y CH_3HgCl) y la eficacia relativa de los consumidores. Incluso en el agua de mar, donde el excedente de Hg(II) sobre el MeHg es muy grande, el mercurio orgánico es más bioacumulado por los padores que el inorgánico.

La mayor eficacia en la transferencia de MeHg hacia los niveles más altos de la cadena alimentaria parece que es debida a que la rápida solubilidad lipídica del CH_3HgCl , permite su retención en los tejidos grasos de los animales terrestres. Sin embargo, en los peces, la carga de MeHg en el tejido muscular es más importante que en los lípidos (tejidos grasos), por lo que la bioacumulación no se explicaría solamente por la liposolubilidad del MeHg (Boudou & Ribeyre, 1997).

Parece ser que, en el caso del pescado, existe una elevada especificidad de la pared intestinal para la absorción del MeHg. En contraposición, el mercurio inorgánico se absorbe en la superficie de las microvellosidades, dando como resultado un ritmo de consumo muy bajo (Boudou & Ribeyre, 1997). Como resultado, la proporción media de MeHg sobre el Hg total aumenta casi un 10% en la columna de agua, un 15% en el fitoplancton, un 30% en el zooplancton y un 95% en los peces (Watras & Bloom, 1992).

La acumulación de MeHg en organismos superiores se produce más por la ingestión de alimentos contaminados con MeHg que por consumo directo de agua (Cabana & Rasmussen, (1994); Cabana et al., 1994).

2.5. PRODUCCIÓN Y USOS

El Hg se encuentra en muchos tipos de rocas, aunque su mena principal es el cinabrio (alfa-HgS), desde el que se recupera un 86.2%.

Su extracción se lleva a cabo por calentamiento en hornos o retortas (estas últimas se utilizan cuando el horno es pequeño). Durante el calentamiento hay que controlar la temperatura porque solamente se libera suficiente cantidad del metal por encima de 300° C, siendo esta la temperatura límite por debajo de la cual puede calentarse sin peligro de pérdida y/o envenenamiento de los trabajadores.

Los mayores productores son Italia, México, España y Yugoslavia.

La contaminación ambiental por Hg es consecuencia del amplio uso que el hombre hace de este metal en base a sus características físico-químicas. Además, el Hg elemental se transporta eficazmente como un gas alrededor del globo e, incluso, las áreas remotas muestran una polución originada por las fuentes industriales (Morel et al., 1998).

Podemos señalar su utilidad a distintos niveles:

2.5.1. Ocupacional

- minería
- refinado de Hg
- producción de baterías, lámparas, termómetros
- fungicida contra hongos de los Géneros *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Ustilago* y *Septoria*.

- explosivos
- pigmentos
- fotografía
- amalgamas dentales
- cosméticos
- fábricas de plásticos (síntesis de cloruro de vinilo a partir de acetaldehído), donde se utiliza como catalizador.

2.5.2. Doméstico

- termómetros rotos
- espejos
- juguetes
- baterías.

2.5.3. Medicamentoso

- desinfectante
- laxante
- diurético
- espermicida

2.5.4. Alimentario

- por ingestión de marisco y pescado contaminado y productos derivados

Debido a las restricciones en el uso de compuestos de Hg, su concentración en alimentos, excepto pescado, suele ser inferior a 60 µg/kg. Por el contrario, en peces oceánicos, alcanzan hasta 150 µg/kg si bien pueden llegar hasta 1.500 µg/kg en especies predadoras carnívoras.

La sensibilidad específica de los distintos animales, en orden decreciente es: aves > gatos > ovinos > bovinos > cánidos > porcinos > équidos.

La cantidad neta de MeHg representa un serio problema potencial en el ecosistema acuático por su toxicidad y acumulación en tejidos de peces, puesto que estos pueden presentar concentraciones 1.000 -10.000 veces superiores a la del agua de mar.

Se puede afirmar que, con pocas excepciones, casi todo el Hg presente en pescado de agua dulce y salada se halla en forma de MeHg (WHO, 1976; Schladot et al., 1997). Aproximadamente el 95-99 % del Hg en los tejidos de los peces es MeHg (Grieb et al., 1990; Bloom, 1992).

Las bacterias reductoras de sulfatos son responsables de la mayor parte de la metilación del Hg en aguas naturales (Gilmour et al., 1991). En cultivos realizados en el laboratorio con altas concentraciones de Hg (0.5 mM), la bacteria *Desulfovibrio desulfiricans* generó grandes cantidades de MeHg (Choi et al., 1993; Choi et al., 1994a). La metilación del Hg (II) está mediada enzimáticamente por la presencia de cobalamina (Choi et al., 1994b). Para ser metilado por las bacterias sulfo-reductoras o para entrar en la cadena acuática vía fitoplancton o bacterias, el Hg debe ser transportado a través de la membrana lipídica que rodea a los organismos unicelulares. El consumo microbiano de Hg es así un paso clave tanto para la metilación como para la bioacumulación (Morel et al., 1998).

Desde el punto de vista toxicológico, hay que tener en cuenta que el nivel de tolerancia del Hg en los peces es superior al que se registra en la especie humana, de ahí el peligro que puede representar el consumo frecuente del pescado contaminado.

En 1972, el Comité Mixto formado por la Food and Agriculture Organization (FAO) y la Organización Mundial para la Salud (OMS) de Expertos en Aditivos Alimentarios, estableció una Ingesta Semanal Provisional Tolerable (ISTP) de 0.3 mg de Hg total por persona, de los cuales no debe haber más de 0.2 mg en forma de MeHg.

Debido a que estos compuestos se concentran principalmente en los animales acuáticos y las tasas más altas se hallan en los túnidos, la OMS (1976) considera que una ingesta diaria y sostenida de Hg por personas que no sean mujeres embarazadas, que oscile entre 3 y 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal puede originar los primeros efectos de la intoxicación en un 5% de la población general.

2.6. CARACTERÍSTICAS TOXICOCINÉTICAS

2.6.1. Absorción

- Vía inhalatoria: 80%
- Vía oral: buena

- Vía dérmica: importante pero no cuantificada.

La absorción gastrointestinal de sales inorgánicas de Hg es inferior al 15% en el ratón y sobre un 7% en un estudio hecho en voluntarios humanos, mientras que la absorción de los compuestos de MeHg es del orden del 90-95% de la dosis administrada por vía oral, independientemente de si el radical MeHg está unido a proteínas o es administrado como sal en solución acuosa. Por vía inhalatoria la absorción es alta, en humanos se estima que es de un 80%.

El Hg inhalado, independientemente de la forma química, se absorbe casi el 100% a través del alvéolo pulmonar.

El vapor de Hg presenta afinidad por el cerebro. Se oxida rápidamente a Hg^{2+} en los eritrocitos o después de la difusión en los tejidos, por acción de la catalasa; aunque permanece como Hg^0 en la sangre durante un tiempo corto pero suficiente para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE).

2.6.2. Vida media

La vida media biológica para el MeHg es aproximadamente de 70 días, y es virtualmente lineal, mientras que la vida media de las sales inorgánicas de Hg es aproximadamente 40 días. Existen pocos estudios sobre la vida media del Hg elemental o vapor de Hg, pero parece ser lineal con un rango de valores de 35 a 90 días (Casarett & Doull's, 1996).

2.6.3. Transporte y Distribución

Una vez absorbido, su transporte se realiza por los distintos constituyentes de la sangre. La distribución entre los glóbulos rojos y el plasma es diferente. En el caso del vapor de Hg la relación hematíes-plasma es entre 1.5-2 aproximadamente; para las sales inorgánicas de Hg, la relación es de 0.4, mientras que para el MeHg, es de aproximadamente 10.

La distribución del MeHg es más uniforme. La mayor parte va al cerebro, hígado y riñón, pero también se ha detectado en epitelio del tiroides, células medulares de las glándulas adrenales, etc.

La proporción de distribución de las dos formas de Hg entre el pelo y la sangre también difiere, para el Hg orgánico es de aproximadamente 250 (WHO, 1976).

El riñón contiene las mayores concentraciones de Hg tras la exposición a las sales inorgánicas y al vapor de Hg, mientras que el Hg orgánico tiene una mayor afinidad por el cerebro, particularmente la corteza posterior. El vapor de Hg tiene mayor predilección por el sistema nervioso central (SNC) que las sales inorgánicas mercuriales, y menor que las sales orgánicas.

Unido a las proteínas, atraviesa la BHE por difusión pasiva mediante transportadores de aminoácidos, acumulándose en el cerebro y el 90% en los eritrocitos. También puede alcanzar al feto. Los brotes por intoxicación con MeHg producidos en Japón e Irak, han demostrado la sensibilidad del feto a los efectos neurotóxicos (Grandjean, 1994).

2.6.4. Biotransformación

Se ha visto que el MeHg reacciona con un grupo de fosfolípidos propios de las células nerviosas llamados plasmalógenos. Estos fosfolípidos tienen un enlace vinil-éter ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{O} -$), en lugar de los enlaces éster de la mayor parte de los lípidos. Parece que el alquilHg , al reaccionar con el plasmalógeno, rompe el enlace vinil-éter y lo hidroliza con liberación de aldehídos esteáricos y palmíticos, tóxicos a su vez, y que contribuyen a alterar la estructura de la membrana y a la lisis celular. Concluye con degeneración neuronal, especialmente en corteza visual, cerebelo y ganglios nerviosos. En cierto modo este mecanismo de acción es similar al del veneno de serpientes, que contiene fosfolipasas que hidrolizan los plasmalógenos con producción de otras sustancias tóxicas. El MeHg también inhibe la captación de precursores y liberación de acetil colina (Ach) (Repetto, 1997).

La desmetilación ocurre en riñón, hígado, bazo y heces, y la desetilación en riñón, hígado y cerebro.

2.6.5. Eliminación

- Biliar
- Renal
- Leche
- Pelo.

La orina y las heces son las rutas preferentes de eliminación para los compuesto inorgánicos (WHO, 1976). La mayor parte del metilHg se excreta en heces desde el hígado por vía biliar.

Aunque la leche materna puede contener solamente un 5% de la concentración de Hg materno, la exposición neonatal al Hg puede ser aumentada por la lactancia (Grandjean et al, 1994).

2.7. CARACTERÍSTICAS TOXICODINÁMICAS

2.7.1. Acciones tóxicas principales

El Hg es el elemento metálico con mayor afinidad en medio biológico por los grupos tioles, en forma decreciente $SH > CONH_2 > NH_2 > COOH > PO^{2-}$ y produce una masiva inhibición enzimática Glucosa-6-fosfato, Fosfatasa alcalina, ATPasa, Succinato-DH.

Los efectos dependen del compuesto y la toxicidad se incrementa con la liposolubilidad por lo que las formas alquílicas son más tóxicas que la elemental y las sales inorgánicas. El Hg organometálico deprime el anabolismo de macromoléculas, fundamentalmente de proteínas, pero también de ADN, ARN y ATP, con inhibición de enzimas glucolíticas y respiratorias, desacoplando la fosforilación oxidativa. Estimula la liberación de neurotransmisores, disminuyendo la síntesis de dopamina y reduce la sensibilidad de los receptores neuromusculares de Ach. Altera la captación de glucosa en la BHE e induce la ruptura de la membrana citoplásmica.

El metilmercurio inhibe la acción de la Na^+K^+ -ATPasa en el paso de desfosforilización, ya que origina un cambio conformacional en la enzima; como consecuencia bloquea la bomba de Na^+ .

En la intoxicación por MeHg se deprime el sistema colinérgico por su acción inhibitoria de la acetil colina transferasa, tanto en el núcleo estriado como en la corteza cerebral, manifestándose en animales de experimentación por disminución de la actividad motora, disfunción rotatoria e hipertermia. Inhibe los receptores muscarínicos de la acetil colina en cerebro por bloqueo de los grupos -SH y produce pocos cambios en la acetilcolinesterasa cerebral. También inhibe la transmisión de la acetil colina en las uniones neuromusculares. Impide la entrada de dopamina, serotonina y noradrenalina (por este orden) en los sinaptosomas estriados, hipotalámicos y corticales respectivamente. Dosis altas de MeHg (15-50 mg/kg) disminuye la síntesis de dopamina y no de otras aminas biógenas, lo que sugiere la sensibilidad de las rutas dopaminérgicas con interferencia de mecanismos colinérgicos y de neurotransmisores.

El MeHg induce la liberación de neurotransmisores, debido a la alteración en la homeostasis del Ca^{2+} intrasinaptosomal y al incremento de la permeabilidad de la membrana neuronal.

Shenker et al. (1999), estudian y definen el mecanismo mediante el cual el metilmercurio induce apoptosis en las células-T humanas. Es debido a que el tóxico reduce el pH intracelular y se alteran las mitocondrias disminuyendo de tamaño y con pérdida de la arquitectura de las crestas en las células intoxicadas. Además, cuando en las células se produce una deplección del tior, se incrementa la susceptibilidad a la apoptosis. Para estos autores, el órgano diana de la toxicidad del MeHg es la mitocondria.

2.7.2. Principales efectos tóxicos

Es muy amplia la bibliografía sobre el Hg respecto a su exposición y a sus efectos. Podemos resumir los órganos diana según sean las formas del Hg:

- Sistema nervioso central (SNC): para el Hg elemental y alquil mercuriales de cadena corta.
- Sistema respiratorio: Para todas las combinaciones gaseosas, vapores y partículas.
- Riñón: Para el Hg mercúrico y organomercuriales.
- Sistema digestivo: Para las sales mercuriosas.
- Piel: Para todas las formas. Se produce alteración del sistema inmune.

El tipo de efecto predominante varía en función de la especie química y del animal. El Hg organometálico en exposición prenatal es teratogénico y neurotóxico, produciendo ataxia motora y síntomas mentales. La exposición aguda postnatal induce alteraciones vasculares y respiratorias, depresión del sistema nervioso, coma y muerte.

Tras un período de latencia de 16 a 38 días, aparece la sintomatología neurotóxica, con parestesias, ataxia, disartria, restricción del campo visual, sordera y signos extrapiramidales con tremor e hiperreflexia. Se produce degeneración neuronal cortical con atrofia selectiva de la capa granulosa. También se desencadenan alteraciones renales, anorexia y enrojecimiento cutáneo.

En especies marinas y de agua dulce, las concentraciones tóxicas de sales de

mercurio varían entre 0.1 y 200 µg/L. La toxicidad aumenta a menor salinidad y a mayor temperatura.

En peces, los síntomas de intoxicación aguda por Hg son: pérdida de equilibrio, movimientos más lentos, incremento de la frecuencia de los movimientos respiratorios y brillo de las cubiertas branquiales. En casos de exposición crónica se incluyen: lesiones cerebrales, incoordinación motora, disminución de la respuesta a cambios de luz, cataratas y comportamientos erráticos (Brunner & Stolle, 1995).

La toxicidad del Hg en aves varía mucho en función de la forma de presentación, dosis, vía de entrada, especie, sexo, edad y condiciones fisiológicas. Los síntomas que aparecen son: descoordinación muscular, lentitud en los movimientos, caídas, hiporreactividad e hipoactividad (Cuadrado et al., 1995).

2.8. EFECTOS TÓXICOS DEL METILMERCURIO

El MeHg es la forma más importante de Hg en términos de toxicidad y de los efectos sobre la salud en relación con la exposición ambiental. Muchos de los efectos producidos por los álcalis a corto plazo son únicos en términos de toxicidad de Hg pero no son específicos puesto que pueden ser encontrados en otros estados de enfermedad (Casarett & Doull's, 1996).

El MeHg es más neurotóxico que las sales inorgánicas debido a su mayor liposolubilidad, que permite la entrada en el sistema nervioso.

El MeHg y los mercuriales orgánicos son hidrofóbicos. Estas características les permite atravesar con facilidad la BHE y la placenta, por tanto el principal órgano diana en la intoxicación por MeHg es el cerebro, particularmente en desarrollo. Durante el período de desarrollo fetal produce una marcada dismorfogénesis cerebelosa debido a que el MeHg se une fuertemente a las proteínas y a los grupos solubles sulfhidrilos. La unión a estos grupos -SH de los microtúbulos produce una depolarización catastrófica de los microtúbulos inmaduros tirosinados. Sin embargo, los microtúbulos acetilados más maduros, son resistentes a la depolimerización inducida por el MeHg (Philbert et al., 2000). También se ha podido demostrar en poblaciones expuestas al MeHg un efecto genotóxico que resulta de una aberración en los cromosomas.

El paso del MeHg a través de la placenta se ha demostrado no sólo por los efectos que produce en el feto, sino también por la detección de dicho tóxico en la sangre

del cordón umbilical en gestantes no especialmente expuestas (Soria et al., 1992).

A nivel hematológico, atraviesa la membrana eritrocitaria y se fija a la hemoglobina en una proporción hematíe/plasma de hasta 9/1. Aumenta la síntesis de una proteína protectora del daño tisular, la metalotioneína (Borreguero et al., 1994).

Tanto los signos como los síntomas aparecen después de un período latente o silencioso de varias semanas o meses. El primer síntoma es la parestesia en las extremidades y posteriormente aparecen signos más serios como ataxia y disartria. En tercer lugar puede aparecer neurastenia y sensación generalizada de debilidad, fatiga e incapacidad de concentración. En intoxicaciones moderadas o severas se manifiesta reducción del campo visual y de la audición (Clarkson, 1988). También puede aparecer espasticidad y tremor y finalmente coma y muerte (Casarett & Doull's, 1996).

Una publicación de la OMS (WHO, 1990) recoge las características del daño en la intoxicación por MeHg:

- Período de latencia de varios meses.
- Daño exclusivamente limitado al sistema nervioso, especialmente al SNC.
- Áreas del daño cerebral muy localizadas (focales), por ejemplo corteza visual y capa granular del cerebelo.
- Los efectos en casos severos son irreversibles, debido a la destrucción de las células neuronales.
- Los primeros efectos no son específicos: parestesia, visión borrosa y malestar.

Durante la intoxicación por MeHg se deprime el sistema colinérgico por su acción inhibitoria de la acetil transferasa, tanto en el núcleo estriado como en la corteza cerebral, manifestándose en animales de experimentación por disminución de la actividad motora, disfunción rotatoria e hipertermia. Inhibe los receptores muscarínicos de la Ach en cerebro por bloqueo de los grupos -SH y produce pocos cambios en la acetilcolinesterasa cerebral.

El daño asociado con la exposición prenatal se generaliza en todo el SNC en contraste con el daño focal en la exposición adulta. En humanos se manifiesta por una sintomatología clínica caracterizada por disfunción motora y retraso mental. El efecto

patológico incluye hipoplasia de la corteza cerebral, arquitectura cortical anormal, pobre mielinización y daño neuronal degenerativo. En los casos menos severos, los recién nacidos pueden parecer completamente normales y desarrollar los déficits neurológicos una vez madurado el SNC.

En la experimentación animal, los efectos del MeHg sobre el cerebro fetal varían dependiendo del período de la gestación en que las madres son tratadas. La intoxicación al comienzo de la gestación origina migración neuronal anormal en el cerebro fetal, mientras que en la última fase induce degeneración focal de las neuronas de la corteza cerebral.

2.8.1. Factores que modifican la toxicidad del metimercurio

El selenio, presente en pescados y mariscos, forma complejos con el MeHg y da lugar a una acción protectora (Seyffart, 1997), disminuyendo así la acción tóxica del MeHg (Ganther et al., 1972; Eide et al., 1995). La acción protectora del ion selenio, en el caso del MeHg, no implica un aumento en la excreción de Hg, sino que origina una alteración en su distribución con incremento de la concentración de Hg en el cerebro. Su efecto sobre la toxicidad del MeHg se basa en la inhibición del daño que éste ejerce sobre la membrana celular. En el mecanismo de acción está implicado el glutatión (GSH), que rompe la unión Hg-selenio, reduce el selenio VI a selenio II y favorece la formación del bi-MeHg-selenio II. Una vez en los tejidos, se descompone acelerándose la desmetilación del MeHg.

Otros factores que modifican la toxicidad son la vitamina E, por su poder antioxidante (se ha demostrado que aumenta la tolerancia al MeHg) y el alcohol. El etanol potencia los efectos del MeHg; se cree que aumenta la retención y toxicidad del MeHg en el riñón a concentraciones que no modifican su neurotoxicidad (Soria & Repetto, 1995).

2.8.2. Tratamiento

El tratamiento utilizado en la intoxicación por vapores y sales inorgánicas a base de Penicilina y un tratamiento quelante con BAL no mejoran los efectos neurológicos inducidos por el MeHg. Debe usarse NAP (N-acetil-dl-penicilamina). El éxito depende de la precocidad del tratamiento (Borreguero et al., 1994).

2.9. ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS: MODELO COMPARTIMENTAL DEL MERCURIO Y METILMERCURIO

El transporte y bioconcentración del Hg y MeHg va íntimamente ligado al ciclo del agua .

2.9.1. Ciclo del agua

El agua forma parte de un ciclo cerrado que comienza con la evaporación. Consta de tres fases fundamentales: precipitación, evaporación y circulación del agua superficial y subterránea. Cada una de estas fases supone transporte, almacenamiento temporal y cambio de estado del elemento. La evaporación hacia la atmósfera se genera desde la tierra, los océanos y otras superficies acuáticas. El agua evaporada procede predominantemente de la precipitación, de la parte interceptada por la vegetación, de los océanos, lagos y ríos, del suelo y de la transpiración de las plantas. El vapor atmosférico, escasamente importante al compararlo con la cantidad total del agua del globo, es almacenado durante poco tiempo (tiempo medio de renovación: 8.9 días) antes de volver a la tierra en forma de lluvia, nieve o granizo, y se condensa (rocío y escarcha) tanto en tierra como en los océanos. El agua procedente de la precipitación puede ser interceptada o transpirada por las plantas, puede fluir por la superficie de la tierra hacia los ríos (escorrentía) o puede infiltrarse en la tierra (Fig. 2.2). Gran parte del agua interceptada y de la de escorrentía (más del 80%) vuelve a la atmósfera por evaporación. El agua de la infiltración puede ser almacenada temporalmente, humedeciendo el suelo (tiempo medio de renovación aproximado: 280 días) y después es evapotranspirada. Una parte se filtra hacia zonas más profundas, donde se almacena en forma de agua subterránea (tiempo medio de renovación: 300 años). El agua subterránea es intercambiada activamente y puede ser usada por las plantas, salir al exterior en forma de manantiales o infiltrarse en los ríos. Esta última fase es extremadamente compleja y variable a causa de la gran influencia del metabolismo biológico en su regulación, de la extremada heterogeneidad de la estructura y composición del sustrato y de las variaciones climáticas (Wetzel, 1981).

La fig. 2.2 muestra gráficamente las peculiaridades del ciclo.

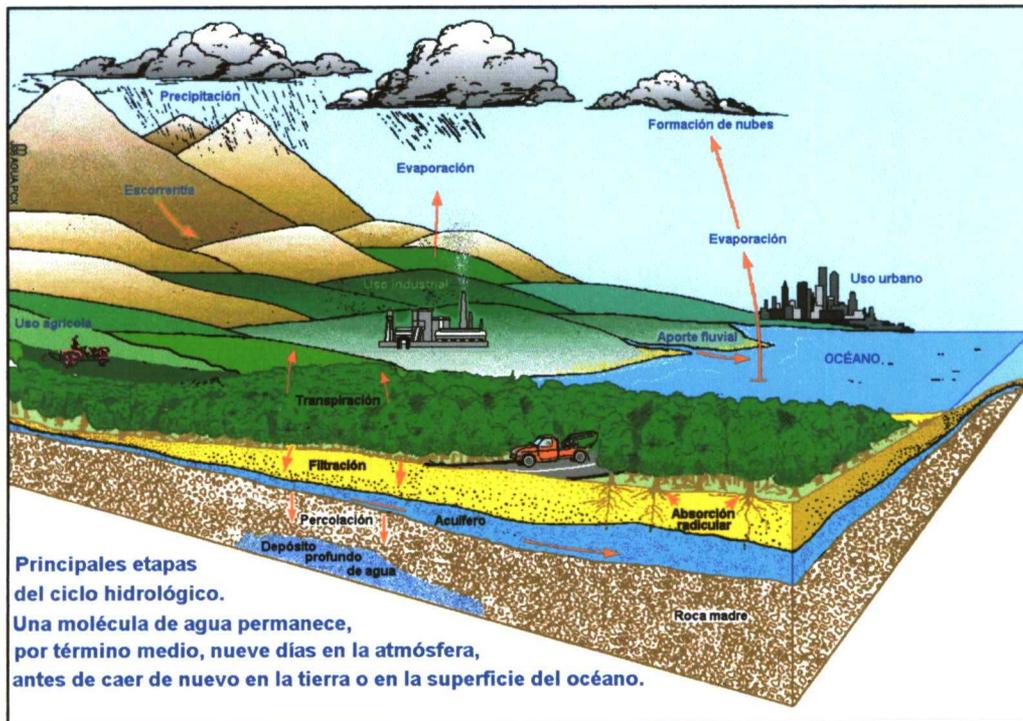


Fig. 2.2: Ciclo del agua (basado en varios autores)

Los compartimientos a tener en cuenta en un modelo acuático del mercurio y metilmercurio serían:

- 4.1.- Agua
- 4.2.- Suspensiones
- 4.3.- Plantas y bacterias
- 4.4.- Invertebrados
- 4.5.- Peces

También puede considerarse el aire, los mamíferos y el hombre.

En este sistema acuático, los parámetros más importantes a determinar serían:

- hidrosolubilidad del xenobiótico, tanto en su forma inorgánica (Hg^{++}), como orgánica (MeHg).
- floculabilidad y retención por sedimentos.
- partición entre el agua y los materiales suspendidos.

- velocidades de degradación y volatización (tensión de vapor), paso al aire.
- capacidad de absorción por la biomasa.
- transformaciones por los seres vivos.
- transferencia entre ellos.

Uno de los ejemplos mejor documentados sobre distribución compartimental ecotoxicológica es el del Hg y MeHg en la bahía de Minamata (Japón) tras producirse una grave intoxicación masiva en gatos y seres humanos, a través del pescado (Figs. 2.3 y 2.4).

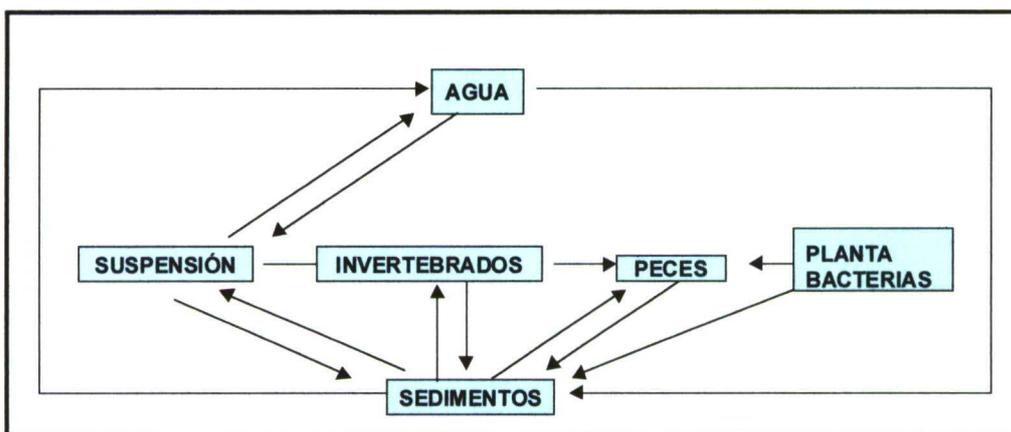


Fig. 2.3: Transporte compartimental de Hg en un ecosistema acuático (Repetto, 1995)

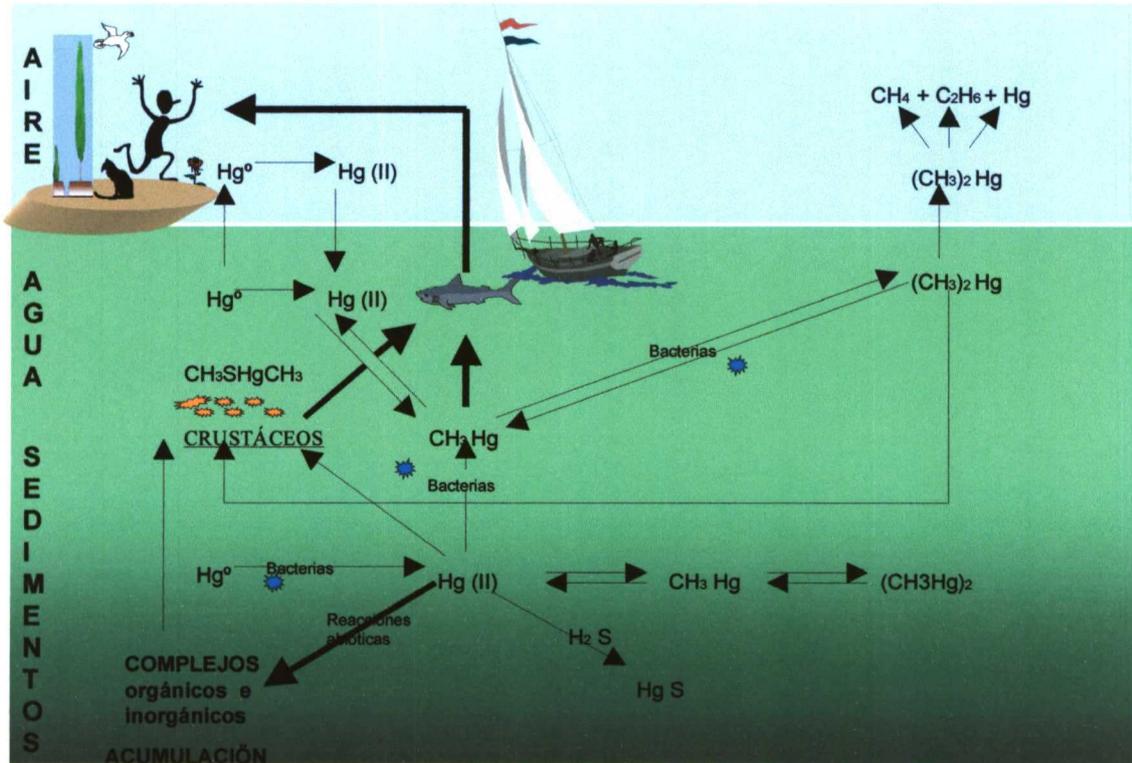


Fig. 2.4: Ciclo del Hg en un ecosistema acuático y distribución compartimental de Hg y MeHg (Basado en Comisión on Life Sciences, 2000; Repetto, 1995)

9.10. REFERENCIAS

1. Al-Muftly Aw; Copplestone JF; Kazantzis G; Mahmoud RM; Majid MA. Epidemiology of organomercury poisoning in Iraq. Incidence in a defined area and relationship to the eating of contaminated bread. *Bull World Health Organ.* 1976; 53 suppl: 23-26.
2. Al-Tikriti K & Al-Muftly AW. An outbreak of organomercury poisoning among Iraqi farmers. *Bull World Health Organ.* 1976; 53 suppl: 15-21.
3. Amyot M; Gill GA; Morel FMM. Production and loss of dissolved gaseous mercury in the coastal waters of the Gulf of Mexico. *Environ Sci Technol.* 1997a; 31:3606-11
4. Amyot M; Lean DRS; Mierle G. Photochemical formation of volatile mercury in high arctic lakes. *Environ Toxicol Chem:*1997b; 16: 2054- 63.
5. Amyot M; Mierle G; Lean DRS; McQueen DJ. Effect of solar radiation on the formation of dissolved gaseous mercury in temperate lakes. *Geochim Cosmochim Acta.* 1997c; 61: 975-88.
6. Bertram HP; Kemper FH & Zenzen C. Man a Target of Ecotoxicological Influences. *Polutants and their ecotoxicological significance.* Ed. HW Nürnbe. 1984; Cap. 26: 415- 439.
7. Bioschio AA; Hendhel DS. Riskassessment of mercury exposure through fish consumption by the riverside people in the Madeira basin, Amazonian. 1991; *Neurotoxicology.* 1996; 17 (1): 169-175.
8. Bloom NS. On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 1992, 49: 1010-1017.
9. Borreguero Martínez E, Bernal Grávalos C. Intoxicación por metales pesados. En: *Tratado de Medicina Interna.* Ed Médica Panamericana. Madrid. 1994; Tomo 2: 1985-7.
10. Boudou A & Ribeyre F. Mercury in the food web: accumulation and transfer mechanisms in animals. *Metal Ions Biol System.* 1997; 34: 289-319.
11. Brunner B & Stolle A. Lead, cadmium and mercury carry-over to meat products by spices and condiments. *Z. Ernährungswiss.* 1995; 34 (2): 113-7.
12. Burriel Martí F, Lucena Conde F, Arribas Jimeno S, Hernández Méndez J. *Química analítica cualitativa.* 11 ed. Madrid, Ed. Paraninfo. 1983, 10: 436.
13. Cabana G; Tremblay A; Kalff J; Rasmussen JB. Pelagic food chain structure in Ontario lakes: a

- determinant of mercury levels in lake trout (*Salvelinus namaycush*). Can J Fish Aquat Sci. 1994; 51: 381-89.
14. Capó Martí MA. Empleo de Bioindicadores Celulares en Neurotoxicología Medioambiental. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá. Facultad de Ciencias. 1998.
 15. Casarett & Doull's. In : Toxicology- The basic science of poisons- 5ª Edition. Cap. 23: Toxic effects of metals (Robert A. Goyer), 1996. pp. 709-712. Cabana G & Rasmussen JB. Modelling food chain structure and contaminant bioaccumulation using stable nitrogen isotopes. Nature. 1994; 372: 255-57.
 16. Choi SC; Barta R. Cobalamin-mediated mercury methylation by *desulfovibrio desulfuricans* LS. Apl Environ Microbiol. 1993, 59: 290-95.
 17. Choi SC; Chase T Jr; Barta R. Metabolic pathways leading to mercury methylation in *Desulfovibrio desulfuricans* LS. Apl Environ Microbiol. 1994; 60: 4072-77.
 18. Choi SC; Chase T Jr; Barta R. Enzymatic catalysis of mercury methylation in *Desulfovibrio desulfuricans* LS. Apl Environ Microbiol. 1994; 60: 1342-46.
 19. Christrup J. Apartheid and pollution. Greenpeace. 1990 May-Jun; 18.
 20. Clarkson TW; Friberg L; Hursh JB & Nylander, M. The prediction of intake of mercury vapor from amalgams. En : Clarkson TW, Friberg L, Nordberg GF, Sager P. (eds). Biological monitoring of metals. New York. Ed. Plenum Press. 1988. 247-264.
 21. Commission on Life Sciences. Toxicological Effects of Methylmercury. Nat'l Academy Press, 2000; page 13, in ch.(Internet).
 22. Cuadrado C; Kumpulainen J; Moreiras O. Lead, cadmium and mercury contents in average Spanish market basket diets from Galicia, Valencia, Andalucía and Madrid. Food Addit Contam. 1995; 12(1): 107-18.
 23. Duffus JH. Toxicología Ambiental. Ed. Omega S.A., Platón, 26. Barcelona. 1991; pp 82-87.
 24. Eide R; Schionning JD; Ernst E; Hansen IM; Wesenberg GR. Mercury content in rat teeth after administration of organic and inorganic mercury. The effects of interrupted exposure and of selenite. Acta Odontol Scand. 1995 Feb; 53 (1): 12-16.
 25. FAO/OMS . Evaluación de diversos aditivos alimentarios y de los contaminantes Hg, Pb y Cd². Decimosexto informe del Comité FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios, informe nº 51, serie de informes técnicos 505. 1973.
 26. Fitzgerald WF & Mason RP. Biogeochemical cycling of mercury in the marine environment.

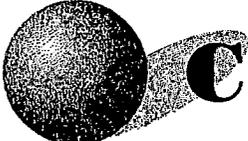
Metallos Biol. Syst.1997; 34: 53-111.

27. Fitzgerald WF; Engstrom DR; Mason RP; Nater EA. The case for atmospheric mercury contamination in remote areas. *Environ Sci Technol.* 1998; 32: 1-12.
28. Fitzgerald WF; Vandal GM; Mason RP; Dulac F. Air-water cycling of mercury in lakes. In: *Mercury pollution-Integration and Synthesis.* Ed. CJ Watras, JW Huckabee. 1994; pp.203-20. Boca Raton, FL:CRC.
29. Ganther HE; Goudie C; Sunde ML; Kopecky MJ; Wagner P. Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Science.* 1972 Mar 10; 175 (26): 1122-4.
30. Gilmour CC; Henry E.A. Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. *Environ Pollut.* 1991; 71: 131-69.
31. Grandjean P; Weihe P; Nielsen JB. Methylmercury: significance of intrauterine and postnatal exposures. *Clin Chem.* 1994 Jul. 40 (7 Pt 2):1395-400.
32. Grandjean P; White RF; Nielsen A; Cleary D; de Oliveira-Santos EC. Methylmercury neurotoxicity in Amazonian children downstream from gold mining. *Environ Health Perspect.* 1999 Jul; 107 (7): 587-91.
33. Grieb TM; Driscoll CT; Gloss SP; Schofield CL; Bowie GL & Porcella DB Factors affecting mercury accumulation in fish in the upper Michigan Peninsula. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 1990; 9: 919-930.
34. Gustin MS; Taylor GE; Leonard TL; Keislar RE. Atmospheric mercury concentrations associated with both natural and anthropogenic enriched sites, central western. Nevada. *Environ Sci Technol.*1996; 30: 2572-79.
35. Gustin MS; Taylor GE; Maxey RA. Effect of temperature and air movement on the flux of elemental mercury from substrate to the atmosphere. *J Geophys Res*1997; 102 (D3): 3891- 98.
36. Hudson RJM; Gherini SA; Fitzgerald WF & Porcella DB. Anthropogenic influences on the global mercury cycle: a model-based analysis. *Water Air Soil Pollut.* 1995; 80: 265-72.
37. Lindberg SE; Kim KH; Munthe J. The precise measurement of concentration gradients of mercury in air over soils: a review of past and recent measurements. *Water Air Soil Pollut.* 1995, 80: 383-92.
38. Lindqvist O et al. Mercury in the Swedish environment. *Water Air Soil Pollut.* 1991; 55: 23-30.
39. Magos L. Mercury. En:Seiler HG, Sigel H (eds.) *Handbook on toxicity of inorganic compounds.*

New York, Ed. Marcel Dekker. 1988; 35:420.

40. Magos L. Three cases of methylmercury intoxication which eluded correct diagnosis. *Arch Toxicol.* 1998 Nov; 72 (11): 701-5.
41. Mason RP; Reinfelder JR; Morel FMM. Uptake, toxicity, and tropic transfer of mercury in a coastal diatom. *Environ Sci Technol.* 1996, 30: 1835-45.
42. Mason RP; Fitzgerald WF; Morel FMM. The biogeochemical cycling of elemental mercury: anthropogenic influences. *Goechim. Acta.* 1994; 58: 3191-98.
43. Meili M. Mercury in lakes and rivers. *Metal Ions Biol. Syst.* 1997; 34: 21-51.
44. Morel FMM; Kreapiel AML; Amyot M. The chemical cycle and Bioaccumulation of mercury. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1998; 29: 543-66.
45. Munro, IC.; Charbonneau, S.M. Contaminantes Ambientales. En: *Sanidad Alimentaria. H.R. Roberts (ed.), Editorial Acribia, S.A. 1981. Zaragoza.*
46. Munthe J. The aqueous oxidation of elemental mercury by ozono. *Atmos Environ.* 1992; 26^a: 1461-68.
47. Munthe J, Xiao ZF & Lindqvist O. The aqueous reduction of divalent mercury by sulfite. *Water Air Soil Pollut.* 1991; 56: 621-30.
48. NIOSH. National Institute for Occupational Safety and Health. *Occupational Diseases. A guide to their recognition.* DHEW (NIOSH) Publication nº 77-181. Revised edition, 1977; 371.
49. Onat E. Solubility studies of metallic mercury in pure water at various temperature. *J Inorg Nucl Chem.* 1974; 36:2029-32.
50. Philbert, M.A.; Billingsley, M.L.; Reuhl, K.R.. Mechanisms of injury in the central nervous system. *Toxicol Pathol* 2000. Jan-Feb; 28 (1). 43-53.
51. Pierce, P.E. Alkylmercury poisoning in humans: Report of an outbreak. *JAMA* 1972; 220: 1439.
52. Ratcliffe, H.E.; Swanson, G.M.; Fischer, L.J. Human exposure to mercury: a critical assessment of the evidence of adverse health effects. *J Toxicol Environ Health.* 1996 Oct; 25. 49 (3): 221-70.
53. Repetto, M. *Toxicología Fundamental.* 3ª edición. Ed. Díaz Santos, S.A. Madrid, 1997.
54. Sanemasa I. The solubility of elemental mercury vapor in water. *Bull Chem Soc Jnp.*, 1975; 48: 1795-98.

55. Schladot JD; Backhaus F; Ostapczuk P; Emons H. Eel-pout (*Zoarces viviparus* L.) as a marinembioindicator. *Chemosphere*. 1997 May; 34 (9-10): 2133-42.
56. Schroeder W; Lindqvist O; Munthe J; Xiao Z. Volatilization of mercury from lake surfaces. *Sci Total Environ*. 1992; 125: 47-66.
57. Seiber J.N. Industrial and Environmental Chemicals in the Human Food Chain. Part Two OrganicChemicals. In: *Chemicals in the Human Food Chain*. C.K. Winter, J.N. Seiber, C.F. Nuckton (eds.), Van Nostrand Reinhold, 1990. New York.
58. Seigneur C; Wrobel J; Constantinou E. A chemical kinetic mechanism for atmospheric inorganic mercury. *Enviro Sci Technicol*. 1994, 28: 1589-97.
59. Seyffart G. Mercury. In: *Poison Index. The Treatment of Acute Intoxication*. Pabst Science Publishers. Berlín, 1997. P.428-40.
60. Shenker BJ; Guo TL; Shapiro IM. Induction of apoptosis in human T-cells by methyl mercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999 May; 15, 157 (1): 23-35.
61. Smith JC; Farris FF; Burg R. Chemical type of mercury in patients in the outbreak of organomercury poisoning in Iraq. *Bull World Health Organ* 1976; 53 suppl: 61-63.
62. Snyder R.D. Congenital mercury poisoning. *NEJM* 1971; 284:1014.
63. Soria ML; Sanz P; Martínez D; López Artíguez M; Nuñez M; Grilo A & Repetto M. Total mercury and methylmercury in hair, maternal and umbilical blood and placenta from women of the Sevilla area. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1992; 48/4: 494-501.
64. Soria MS & Repetto M. " Estado actual de la toxicología del Hg". En: *Toxicología avanzada*. Editor M. Repetto. Ed. Díaz de Santos, S.A. 1995; Cap. 9: 359-391.
65. Watras CJ & Bloom NS. Mercury and methylmercury in individual zooplankton: implication for bioaccumulation. *Limnol Oceanogr*. 1992, 37: 1313-18.
66. Wetzel RG. La economía del agua. In: *Limnología*. Ed. Omega, S.A., Barcelona. 1981; Cap. 4 y 16; 679 pp.
67. WHO. Methylmercury. Environmental Health Criteria 101. Geneva. World Health Organization, 1990.
68. WHO. Environmental Health Criteria 1: Mercury. World Health Organization, Geneva, 1976.
69. Woodall J. *The Surgeon's or mimitary & domestic surgery*. London, 1639; 256 pp.



CAPÍTULO 3

3.BIOINDICADORES

3.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS

Existen muchas definiciones del término "bioindicador". Desde el punto de vista de su etimología se define como un ser vivo que indica las condiciones del medio en que vive.

Los bioindicadores o indicadores biológicos también se pueden definir como organismos que se utilizan para controlar ciertos factores del medio ambiente o para estudiar niveles y tipos de contaminación (Seoanez, 1996).

Otra definición sería la de aquellos organismos o comunidades en los que su existencia, sus características estructurales, su funcionamiento y sus reacciones dependen del medio en que se desarrollan y cambian al modificarse las condiciones ambientales (Capó et al., 1998).

También se puede definir como especie que manifiesta de modo apreciable la presencia o el cambio de algún elemento del ambiente, alterando alguna de sus funciones. Su observación permite la prevención y detección de un contaminante.

El Vocabulario Científico-Técnico (1996), define bioindicador como taxón que puede ser utilizado como indicador de algún factor ecológico como temperatura, humedad, características topográficas, etc.

Según estas definiciones, se puede deducir que, puesto que todos los seres vivos responden a los factores ambientales, todos ellos son bioindicadores y, en sentido amplio, lo son, pero unos son mejores o más útiles que otros, bien porque respondan mejor, o porque las respuestas sean más interesantes.

Los bioindicadores son sensibles a los cambios ambientales y reaccionan a ellos como si fueran estímulos específicos.

La capacidad de respuesta de los bioindicadores depende de distintos factores:

- De la composición genética del organismo, porque puede favorecer o no la adaptación a los cambios y por tanto la manifestación de respuestas fácil y rápidamente visibles.

- De su estado de desarrollo, pues hay etapas en el ciclo vital que son más influenciadas; por ejemplo, los individuos juveniles suelen ser más sensibles, mientras que los adultos suelen ser más resistentes.

- De las propias condiciones ambientales, porque los estímulos pueden ser infinitamente variados y sus efectos no siempre son aditivos, sino que puede haber sinergismos o efectos potenciadores de unas condiciones frente a otras.

3.2. TIPOS DE BIOINDICADORES

Los bioindicadores pueden clasificarse atendiendo a diferentes criterios. El más sencillo consiste en atender al grado de sensibilidad que muestran frente a los estímulos ambientales; así, se puede diferenciar especies **muy sensibles**, **sensibles**, **poco sensibles** o **resistentes** (Podani, 1992).

Otro criterio sería según la forma de respuesta a los estímulos, en cuyo caso se puede hablar de:

•**Detectores:** Bioindicadores que viven naturalmente en un área y que, simplemente, muestran respuestas tales como cambios de vitalidad, mortalidad, capacidad reproductora, abundancia, etc., ante los cambios ambientales que se produzcan en su entorno. Por ejemplo, los musgos epífitos que viven en las ciudades se vuelven estériles o se atenúa mucho su capacidad reproductora por causa de la contaminación atmosférica.

•**Explotadores:** Bioindicadores cuya presencia indica la probabilidad elevada de que exista una perturbación. Con frecuencia son organismos que, de forma más o menos repentina, se hacen muy abundantes en un lugar, casi siempre debido a falta de competidores que han sido previamente eliminados por la perturbación. Por ejemplo, la abundancia de ciertas cianobacterias indica que las aguas están eutrofizadas; la abundancia de ortigas indica que hay acúmulos de materiales ricos en nitratos en ese lugar.

•**Centinelas:** Bioindicadores sensibles o muy sensibles, que se introducen artificialmente en un medio y funcionan como alarmas, porque detectan rápidamente los cambios. Se utilizan fundamentalmente para detectar contaminantes.

•**Acumuladores:** Bioindicadores que, por lo general, son resistentes a ciertos compuestos, por ser capaces de absorberlos y acumularlos en cantidades medibles. Por ejemplo, ciertos briofitos acumulan metales pesados en cantidades apreciables; el ray-grass (*Lolium perenne*) es resistente a los metales pesados.

•**Organismos test o bioensayo:** Bioindicadores que se utilizan en el laboratorio a modo de reactivos para detectar la presencia y/o la concentración de contaminantes. Son bioindicadores sensibles, tanto plantas como bacterias y, en algunos casos, ratas y ratones. Además de utilizarse para detectar contaminantes y su concentración, también se suelen usar para establecer listas de contaminantes en orden de toxicidad.

Atendiendo al criterio de posibilidad de cuantificar las respuesta, los bioindicadores pueden ser:

•**Bioindicadores en sentido estricto:** son aquellos que con su presencia o ausencia y abundancia indican los efectos de un factor ambiental de forma cualitativa; pueden ser tanto **positivos**, por su presencia y/o abundancia, como **negativos**, por su ausencia.

Como ejemplo de bioindicadores positivos se pueden citar a aquellas plantas que sólo viven en lugares donde hay ciertos metales como Pb, Cu o Au, ya que con su presencia indicarán la existencia de esos metales en el sustrato. Como ejemplo típico de bioindicadores negativos podemos recordar a los líquenes, que por ser muy sensibles a los contaminantes de la atmósfera urbana suelen desaparecer de las ciudades (de Filippis et al., 1994).

•**Biomonitores:** son especies que indican la presencia de contaminantes o perturbaciones no sólo de forma cualitativa, sino también de forma cuantitativa, porque sus reacciones son de alguna manera proporcionales al grado de contaminación o perturbación.

Las especies pueden ser biomonitores bien porque reaccionen de una forma determinada y medible, es decir, por sus reacciones manifiestas, o bien porque acumulen los contaminantes y lleguen a tenerlos en cantidades medibles, es decir, por acumulación.

Por otra parte, los biomonitores, pueden ser a su vez **pasivos**, si son naturales en la zona que se esté considerando, o **activos**, si son introducidos por el hombre mediante transplantes. Por ejemplo, algunos briofitos, como ya hemos dicho anteriormente, tienen capacidad para acumular metales pesados; en su hábitat típico serían biomonitores

acumuladores pasivos, pero si se transplantan a lugares donde se sospecha la presencia de metales pesados, los briofitos irán acumulandolos y se podrán medir las cantidades acumuladas, en cuyo caso serían biomonitores acumuladores activos (Filip et al., 1979).

La Tabla 3.I recoge de forma esquemática los distintos tipos de bioindicadores (Ederra, 1996).

CRITERIO	Tipos de bioindicadores				
GRADO DE SENSIBILIDAD	Muy sensibles Sensibles Poco sensibles Resistentes				
FORMA DE RESPUESTA	Detectores Exploradores Centinelas Acumuladores Organismos test o bioensayo				
POSIBILIDAD DE MEDIDA	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">Bioindicadores en sentido estricto</td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">Biomonitores:</td> <td style="vertical-align: top;"> Por reacciones manifiestas Por acumulación Pasivos (naturales) Activos (Transplantes) </td> </tr> </table>	Bioindicadores en sentido estricto		Biomonitores:	Por reacciones manifiestas Por acumulación Pasivos (naturales) Activos (Transplantes)
Bioindicadores en sentido estricto					
Biomonitores:	Por reacciones manifiestas Por acumulación Pasivos (naturales) Activos (Transplantes)				

TABLA 3.I: TIPOS DE BIOINDICADORES

3.3. CARACTERIZACIÓN DE BIOINDICADORES

Al hablar de bioindicadores en sentido amplio, hay que tener en cuenta que los bioindicadores lo son en principio a nivel local, ya que sus requisitos pueden ser diferentes en distintos puntos geográficos; por ejemplo, algunas plantas que son calcícolas en zonas lluviosas, sin embargo, en zonas más secas son indiferentes, o aquellas que tienen o pueden tener variedades resistentes a diversos factores

ambientales según las zonas del mundo en que se encuentren.

Además, existen muy pocas especies que sean cosmopolitas, es decir, que su área de distribución cubra toda la superficie de la tierra, por lo que los datos acerca de bioindicadores que se conocen de un lugar del mundo pueden no ser utilizables en otros simplemente porque esas especies bioindicadoras no viven allí. Por tanto, sería necesario tener estudios básicos o estudios piloto para establecer qué especies son las más adecuadas como bioindicadoras, así como una idea aproximada previa de cuál sería la extensión de la zona en que esas especies podrían ser útiles como bioindicadoras.

Hay que tener cuidado con los indicadores negativos, o sea por ausencia, pues los motivos por los que una especie no está en un lugar pueden ser muy variados, incluso múltiples y no únicos y no sólo debidos a que le esté afectando alguna perturbación. También hay que tener precaución con los cambios en abundancia. Por ejemplo, un aumento grande de la abundancia de una especie puede tenerse en cuenta si ya previamente se sabe que esa especie depende de un cierto factor, como puede ser una repentina abundancia de ortigas en un lugar; ello quiere decir que allí se han producido acúmulos de nitratos, pues la ortiga es una planta nitrófila. Sin embargo, las disminuciones en la abundancia hay que tratarlas con cuidado, pues pueden deberse a competencia, cambios cíclicos estacionales, cambios genéticos poblacionales, etc., sin que la disminución observada tenga que ver en realidad con la influencia de la contaminación o del factor ambiental que estemos estudiando (Gilbert et al., 1981).

3.4. REQUISITOS QUE DEBEN CUMPLIR LOS BIOINDICADORES

Las especies bioindicadoras en sentido amplio deben cumplir los siguientes requisitos o, al menos, sería bueno que los cumplieran, sobre todo aquellos que son detectores, explotadores o acumuladores (Luque, 1997):

- Dar respuestas de interés para el ecosistema que se esté estudiando y que las respuestas sean relativamente fáciles de observar y/o medir.
- Tener límites de tolerancia estrechos respecto a variables ambientales, es decir, ser estenoicos y no eurioicos.
- Dar respuestas diferentes ante estímulos diferentes.
- Deberían ser sedentarios o tener una capacidad de dispersión limitada.

- Ser fáciles de muestrear. En este aspecto, si las especies son raras no son fáciles de muestrear y por tanto, en este caso, ser común sería una ventaja. Por otra parte, deben estar presentes en cantidad suficiente como para no alterar, o incluso destruir la población, en el caso de que se tengan que hacer muestreos sucesivos.

- Deben ser resistentes a la acumulación de contaminantes (especialmente si se trata de bioindicadores acumuladores), permaneciendo vivos para poder observar sus respuestas, a menos que la mortalidad sea una de las variables a estudiar.

- Sería preferible que fueran organismos de larga vida para poder muestrear diferentes grupos de edades. O por lo menos, el bioindicador ha de tener un tiempo de vida lo suficientemente largo como para que las respuestas se puedan manifestar.

Aunque los mejores bioindicadores son las especies estenoicas, pues sus reacciones son más sensibles, hay casos en que especies euroicas pueden también ser buenas bioindicadoras, precisamente por ser muy comunes y abundantes en zonas amplias, al faltar en algunos lugares concretos, pueden con su ausencia indicar algunos impactos ambientales. Por ejemplo, en Suiza se vio que un briófito muy común y abundante y que generalizado en el país (había datos bibliográficos de su presencia desde el siglo pasado), no se había vuelto a encontrar desde cierto año en varias zonas, que casualmente coincidían con lugares de gran afluencia turística.

3.5. VENTAJAS DE LOS BIOINDICADORES

- Reflejan el complejo efecto de todos los factores ambientales en todo el medio.
- Evitan la tarea de hacer medidas físicas o análisis químicos que, a menudo, requieren tiempo, técnicas, aparatos, personal cualificado y que, a veces, no están disponibles por dificultad de transporte.
- Ayudan a visualizar la velocidad y la dirección de los cambios ambientales.
- Muestran los efectos sobre los seres vivos y su potencial peligrosidad.
- Localizan las zonas de ecosistemas donde las materias tóxicas y contaminantes se acumulan.

En resumen, los bioindicadores dan una imagen bastante exacta de la

extensión de la contaminación que está alcanzando a los seres vivos de un área y de sus efectos. Además, dan una medida de la intensidad del impacto ambiental y de su peligro potencial para otros organismos vivos como el hombre (Luque, 1997).

3.6. BIOENSAYOS

Para que la respuesta de un organismo de prueba a los contaminantes específicos se pueda definir inequívocamente, se hacen bioensayos debido a que se pueden controlar con minuciosidad las condiciones ambientales. Aunque los bioensayos no deben excluir las observaciones en el campo y experimentos "in situ" si se pretende entender todas las repercusiones de un problema de contaminación.

Para seleccionar un organismo adecuado en las pruebas de bioensayo, hay que tener en cuenta varios factores (American Public Health Association, Moriarty 1983):

- 1.- El organismo debe ser sensible a los factores ambientales o materiales en cuestión.
- 2.- Su distribución debe ser amplia, y su disponibilidad en cantidades suficientes, pues ha de mantenerse todo el año.
- 3.- Debe ser importante desde el punto de vista económico, recreativo o ecológico, tanto a nivel local como nacional.
- 4.- Debe poder cultivarse fácilmente en el laboratorio.
- 5.- Debe hallarse en buenas condiciones, libre de parásitos o enfermedades.
- 6.- Debe ser compatible con las técnicas de bioensayo.

Las pruebas de bioensayos se pueden clasificar en bioestímulos y pruebas de toxicidad.

En las pruebas de **bioestímulos** se suelen utilizar algas, y sirven para evaluar la situación relativa a nutrientes de un determinado entorno acuático, distinguir entre la cantidad total de nutrientes y la aprovechable desde el punto de vista biológico, y para determinar los posibles efectos en la calidad del agua sobre el crecimiento de las algas.

Las **pruebas de toxicidad** se utilizan en la protección inicial frente a agentes

químicos, control de vertidos para determinar sus posibles efectos sobre los organismos acuáticos y, en las emisiones tóxicas, para determinar el componente más peligroso con el fin de actuar sobre él.

Los estudios de toxicidad se pueden efectuar con diversos tipos de organismos y éstos serán elegidos según el medio en donde se encuentre el contaminante y las características de éste. Así pues, en ecosistemas acuáticos se suelen emplear peces como: la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), el pez lobo (*Pimephales notatus*), el pez de agallas azules (*Lepomis macrochirus*), el pez dorado (*Carassius auratus*), el guppy (*Poecilia reticulata*), el pez tropical arlequín (*Rasbora heteromorpha*), la perca de boca grande (*Micropterus salmoides*), el pez de agua dulce medaka (*Oryzias latipes*), la anguila (*Anguilla anguilla*) y la perca (*Anabas testudineus*), aunque la tendencia actual apunta a la utilización de un conjunto variado de peces en lugar de una especie única. En los últimos años, el crustáceo *Daphnia*, con sus diversas especies (*magna* y *pulex*), está especialmente indicado para trabajos de rutina, pues es sensible a la contaminación, se cría con facilidad, y su índice de reproducción es elevado. Igualmente existen otros invertebrados que se utilizan en pruebas de toxicidad, destacando el rotífero *Brachionus plicatilis*, el crustáceo marino *Artemia salina* o el *Streptocephalus proboscideus*, utilizándose individualmente o en conjunto.

La Tabla 3.II muestra una lista de especies más comunes de invertebrados utilizados en tests de toxicidad, establecido por Persoone et al., 1989. La pulga acuática (*Moina macrocopa*) y el caracol de agua dulce (*Lymnaea palustris*), se utilizan para valorar la acumulación de lindano, dando mejor resultado que otros crustáceos marinos como *Panaeus duorarum*, *Palaemonetes vulgaris*, *P. purgio* y *Paugurus longicarpus*. También se emplean insectos como *Drosophila*. En ecosistemas terrestres, se utilizan varios como la cucaracha (*Periplaneta americana*), al igual que los gusanos de tierra (*Eisenia foetida*, razas *E. foetida foetida* y *E. foetida andrei*, siendo esta última la más adecuada), el escarabajo de la harina (*Tenebrio molitor*) y el grillo (*Acheta domesticus*). Se ha propuesto recientemente la bacteria luminiscente *Photobacterium fischeri* o *P. phosphoreum* como sustituto de los peces en determinadas pruebas de toxicidad.

Actualmente, para el estudio de contaminantes, se utiliza un sistema de detección rápido y sensible que es el de **cultivos celulares**, tanto de animales como de vegetales.

TABLA 3.II: INVERTEBRADOS UTILIZADOS EN PRUEBAS DE MEDIOAMBIENTE

<u>Protozoos:</u>	<u>Ciliados</u>	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	APHA
<u>Vermes:</u>	<u>Platelmintos</u>	<i>Dugesia tigrina</i>	ASTM
	<u>Anélidos</u>	<i>Limndrilud hoffmeisteri</i>	APHA, FAO
		<i>Tubifex tubifex</i>	APHA, FAO
		<i>Branchiura sowerbyi</i>	APHA, FAO
		<i>Stylodius heringianus</i>	APHA
<u>Moluscos:</u>	<u>Gasterópodos</u>	<i>Physa integra</i>	ASTM
		<i>Physa heterostropha</i>	ASTM
		<i>Amnicola limosa</i>	ASTM
<u>Crustáceos</u>	<u>Branquiopodos</u>	<i>Daphnia magna</i>	APHA,ASTM,FAO,USEPA,OECD
		<i>Daphnia pulex</i>	ASTM, USEPA, OECD
		<i>Daphnia spp.</i>	USEPA
	<u>Amphipodos</u>	<i>Gammarus lacustris</i>	APHA, ASTM, FAO, USEPA
		<i>Gammarus pseudolimnareus</i>	APHA, ASTM, USEPA
		<i>Gammarus fasciatus</i>	APHA, ASTM, FAO, USEPA
		<i>Hyalella azteca</i>	APHA, FAO
		<i>Pontoperia affinis</i>	APHA
		<i>Hyalella spp</i>	USEPA
	<u>Mysidos</u>	<i>Mysis relicta</i>	APHA, FAO
	<u>Decápodos</u>	<i>Palaemonetes cummini</i>	APHA
		<i>Palaemonetes kadakiensis</i>	APHA
		<i>Gammarus spp.</i>	APHA, USEPA, FAO, ASTM
		<i>Orconectes rusticus</i>	APHA
		<i>Orconectes spp.</i>	USEPA, ASTM
		<i>Procambarus spp.</i>	ASTM
		<i>Pacifastacus lenisculus</i>	ASTM, USEPA
<u>Insectos</u>	<u>Plecopteros</u>	<i>Pteronarcys dorsata</i>	APHA
		<i>Pteronarcys californica</i>	APHA
		<i>Pteronarcys spp.</i>	ASTM, FAO
		<i>Hesperoperla lycorias</i>	APHA
		<i>Hesperoperla pacifica</i>	APHA
		<i>Isogenus frontalis</i>	APHA
		<i>Isogenus spp.</i>	FAO
		<i>Perlesta placida</i>	APHA
		<i>Paragnetina media</i>	APHA
		<i>Paragnetina spp.</i>	FAO
		<i>Phasganophora capitata</i>	APHA
		<i>Phasganophora spp.</i>	FAO
		<i>Acroneuria californica</i>	APHA
		<i>Acroneuria spp.</i>	FAO
	<u>Efemerópteros</u>	<i>Hexagenia bilineata</i>	APHA, ASTM, USEPA
		<i>Hexagenia limbata</i>	APHA, ASTM, USEPA
		<i>Hexagenia ridida</i>	APHA
		<i>Hexagenia spp.</i>	FAO
		<i>Ephemerella subvaria</i>	APHA
		<i>Ephemerella comuta</i>	APHA
		<i>Ephemerella grandis</i>	APHA
		<i>Ephemerella doddsi</i>	APHA
		<i>Ephemerella needhanii</i>	APHA
		<i>Ephemerella tuberculata</i>	APHA
		<i>Ephemerella spp.</i>	ASTM, FAO, USEPA
		<i>Stenonema ithaca</i>	APHA
		<i>Stenonema spp.</i>	FAO

<u>Tricopteros</u>	<i>Baetis spp.</i>	ASTM, USEPA
	<i>Brachycentrus americanus</i>	APHA
	<i>Brachycentrus occidentalis</i>	APHA
	<i>Brachycentrus spp.</i>	APHA
	<i>Clistoronia magnifica</i>	APHA
	<i>Hydropsyche bettini</i>	APHA
	<i>Hydropsyche bifida</i>	APHA
	<i>Hydropsyche spp.</i>	FAO
	<i>Macronemum zebratum</i>	APHA
	<i>Macronemum spp.</i>	FAO
	<u>Dípteros</u>	<i>Chironomus plumosus</i>
<i>Chironomus attenuatus</i>		APHA
<i>Chironomus tentans</i>		APHA
<i>Chironomus californicus</i>		APHA
<i>Chironomus spp.</i>		APHA, FAO, USEPA
<i>Glytochironomus labiferus</i>		APHA
<i>Goeldichironomus holoprasinus</i>		APHA
<i>Tanypus spp.</i>		APHA
<i>Tanypus spp.</i>		FAO
<i>Tanytarsus dissimilis</i>		APHA
<i>Tanytarsus spp.</i>		FAO

Recomendados o listados por:

APHA: American Public Health Association

ASTM: American Society for Testing and Materials.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

OECD: Organization for Economic Development and Cooperation.

USEPA: United States Environmental Protection Agency.

3.7. CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL DE LOS EFECTOS ECOTOXICOLÓGICOS

En el estudio experimental de los efectos ecotoxicológicos, las determinaciones que se realizan en la toxicología convencional no sirven más que desde un enfoque aproximativo, ya que de las más de 45.000 sustancias químicas relacionadas por la *Environmental Protection Agency* (EPA) muchas poseen una toxicidad tan débil que originan alteraciones en los organismos vivos tan poco detectables que, según las citadas pruebas empleadas en toxicología convencional, se considerarían como inocuas; pero la realidad es que muchas de ellas representan un peligro ecológico.

Los ecosistemas naturales son un conjunto armónico consecuente a sus propios equilibrios biológicos, y las sustancias químicas pueden perturbar en ocasiones estos equilibrios y alterar la citada armonía. Existen hoy día pruebas claras de que algunos de estos compuestos químicos originan, en los organismos vivos, efectos que no terminan con la muerte, pero que sí perturban, sin embargo, la capacidad para sobrevivir en condiciones ecológicas alteradas, por lo que estos efectos no pueden ser detectados por los procedimientos empleados en la toxicología convencional (Moriarty, 1983). Los estudios experimentales ecotoxicológicos fueron en su día iniciados por medio de la comprobación de efectos sobre determinadas especies. Sin embargo, se ha comprobado que, en general, las poblaciones simples no responden a los polutantes de una manera natural en el aislamiento, ya que las interacciones de organismos o poblaciones requieren conductas y respuestas fisiológicas que no son demostradas en el aislamiento, e incluso el rango de las respuestas a las sustancias químicas es mayor en los sistemas multiespecies que en los sistemas de especie única. Además, los posibles efectos de los compuestos químicos sobre los ecosistemas, en lo que se refiere a sus interacciones específicas, dinámica comunitaria y dominio, no pueden ser detectados por las pruebas de laboratorio de especie única. E incluso debemos tener en cuenta que la capacidad de respuesta de las poblaciones y los ecosistemas a las perturbaciones es limitada, por lo que hemos de reforzar dicha respuesta. Por otro lado, las sustancias químicas pueden sufrir alteraciones en sus propiedades debido a los diversos componentes de los ecosistemas, biológicos o químicos, lo cual puede dar lugar a acumulación o degradación de las sustancias químicas que hay que estudiar, puesto que siempre debemos tener presente que la transformación de los compuestos químicos es una de las funciones de los ecosistemas (Podani, 1992). Todo ello aboga, en la actualidad, por el empleo de sistemas de prueba multiespecies para la evaluación de los posibles efectos de los toxicantes en los ecosistemas naturales. Los métodos que se utilizan para detectar los posibles efectos de las sustancias químicas sobre los ecosistemas se pueden encuadrar en diversos grupos: Medición de los cambios en la dinámica de poblaciones, Estudios de los procesos del ecosistema, Modelos matemáticos y Usos de Bioindicadores (TABLA 3.III).

TABLA 3.III: ESTUDIOS EXPERIMENTALES ECOTOXICOLÓGICOS

I.-MEDICIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA DINÁMICA DE POBLACIONES

A.- Métodos de competición Acuáticos:

- Competición *Diatomea marina* / *Cloroficea* frente a PCB's.

B.- Métodos de competición en Ecosistemas Terrestres:

- Competición entre vegetales (*Trébol* / *Cañuela*, frente al ozono).
- Entre animales (entre especies de *Drosophila*, número de adultos, peso de adultos, desarrollo de machos y de hembras).
- En combinación (mixtos) (*Pulgón* / *Alfalfa*).

C.- Métodos de depredación. (Depredador-Presa):

- (*Peces* / *Renacuajos*).
- Depredación de protozoos: *Rotíferos* / *Paramecios*

D.-Métodos de la interacción Húésped-Parásito:

- Los parásitos de peces frente a determinados plaguicidas-.

E.- Métodos de Simbiosis:

- Modelo *Leguminosas* / *Rhizobium*.

II.- ESTUDIOS DE LOS PROCESOS DEL ECOSISTEMA

A.-Modelos acuáticos:

- Modificación en las comunidades de bacterias, algas y algunos invertebrado junto con microcosmos de estanques.

B.- Modelos terrestres:

- Seguimiento del ciclaje de los nutrientes.
- Captación y transferencia de energía:
 - Parámetros de producción primaria. (CO_2 , N_2 ...)
 - Parámetros de metabolismo comunitario. O_2 , ATP.

III.- MODELOS MATEMÁTICOS

A.- Modelos de simulación de ecosistemas:

- Simulación de procesos bióticos.
- Simulación de procesos abióticos

B.- Modelos de multipoblación generalizada:

- Predecir destino de polutantes (Ej. Metil-mercurio en Minamata).

C.- Modelos de metodología alternativa:

- Valorar la peligrosidad de polutantes:
 1. Análisis de curvas.
 2. Análisis del tiempo medio.
 3. Análisis econométrico (input-output).

IV.- USO DE BIOINDICADORES

A.- Cultivos y líneas celulares.

B.- Biosensores y biomarcadores.

C.-Animal centinela y animal filtro.

3.7.1. Medición de cambios en la dinámica de poblaciones

Dentro de los estudios de interacción de poblaciones, en las que se detectan cambios en la dinámica de poblaciones, se pueden utilizar distintos métodos de competición, de depredación, de interacción y de simbiosis.

3.7.1.1. Métodos de competición Acuáticos

La competición ha sido definida como una interacción entre dos especies, en la que cada población afecta adversamente a la otra, en pugna por un recurso limitado. Entre los estudios de competición en ecosistemas acuáticos es representativo el caso de una diatomea marina (*Thalassiosira pseudonana*) y la cloroficea (*Dunaliella tertiolecta*), al emplear como toxicante PCB's (Poli Cloro Bifenilos) a la concentración de 1 mg/L se observa que el desarrollo de la diatomea se encuentra fuertemente afectado, mientras que el alga verde alcanza alta densidad de población al no ser afectada a dicha concentración, en tanto que, en los cultivos conjuntos de ambas poblaciones sin presencia de toxicantes, las densidades de ambas alcanzan valores muy similares. Además, se comprueba que, en cultivos simples, el desarrollo de la diatomea no es afectado por concentraciones de 25 mg/L de PCB's, lo cual sirve de base para confirmar que existen efectos de toxicantes que no pueden detectarse en poblaciones simples. Como parámetro de la contaminación del sistema de prueba se utiliza el estudio comparativo de las densidades de población de ambas especies, ya que los PCB's perjudican la capacidad de nutrición de la diatomea al competir con la del alga verde. Con un mismo enfoque, también se emplea la letalidad de las poblaciones al valorar la contaminación por cobre.

3.7.1.2. Métodos de competición en Ecosistemas Terrestres

En ecosistemas de pruebas terrestres se pueden emplear métodos de competición entre vegetales, entre animales o entre ambos en combinación. Así, el crecimiento del trébol sería reducido en competición con la cañuela y el ozono a la concentración de 0,03 ppm, ya que la combinación de ozono y cañuela origina inhibición de la nodulación del trébol.

Dentro de los métodos de competición entre especies animales, de las cuales

las más estudiadas son las poblaciones de diferentes especies de *Drosophila*, los parámetros que hay que evaluar son el número de adultos de cada especie, la viabilidad de un determinado estadio vital, la duración de los estadios, el peso de los adultos, la longitud del ala, o la relación de número, peso y tiempos de desarrollo de machos y hembras. En los métodos mixtos de insectos y plantas se pueden emplear como parámetros la reducción o potenciación de los mecanismos defensivos de la planta ante el insecto, es decir, su resistencia. Uno de los sistemas empleados, aunque con otra finalidad, ha sido la competición pulgón-alfalfa.

3.7.1.3. Métodos de depredación:

Reflejan la influencia de los tóxicos sobre la interacción depredador-presa a través de la observación de los cambios de conducta de ambas poblaciones, la cual suele dar como resultado la muerte de la presa. En los modelos de ecosistemas acuáticos son muy variados los métodos que emplean la depredación por peces sobre renacuajos, zooplancton u otros peces, y en general son métodos sencillos, rápidos y fácilmente adaptables a las pruebas de ecotoxicidad, aunque en la actualidad no están todavía ampliamente ajustados a esta finalidad (Brown et al., 1972). En otros métodos se emplea la depredación entre protozoos, lo cual presenta dos ventajas: los protozoos tienen la característica universal de la depredación y esta característica es más fácilmente discernible que en los animales de sexos separados. Se emplea como depredador el *Didinium nasutum* y como presa el *Paramecium aurelia*, utilizando como parámetro la valoración de la densidad de la presa. Todas las interacciones depredador-presa suelen tener alta sensibilidad a las sustancias químicas existentes en el medio, y suele determinarse en ellas el número resultante de presas, después de un tiempo determinado, mientras que en los métodos de depredación pez-zooplancton, lo que suele valorarse es la distancia reactiva, es decir, la distancia que el depredador localiza a la presa, ya que se considera que es un valor reproducible. También se exponen grupos de *Gambusia affinis* y tencas (*Micropterus salmoides*) a concentraciones de mercurio comprendidas entre 0,005 y 0,1 mg/L, determinando el número de gambusias existentes tras 60 horas de vida en común. Hay relación directa entre las concentraciones de mercurio y el número de gambusias supervivientes, aún a dosis tan bajas como 0,01 mg/L, muy alejada de la dosis letal; ello es debido a que, incluso a esas dosis, el mercurio influye sobre la normal capacidad de escape de la presa. En los modelos de ecosistemas terrestres se han empleado, entre otros, interacciones depredador-presa de ácaros herbívoros, ya que son métodos fácilmente realizables en el laboratorio. La mayoría de estos sistemas experimentales consisten en enfrentar ácaros en disputa por una planta huésped, empleándose como parámetro el

número de presas existentes al final de un determinado tiempo, es decir, densidad de población de la presa.

Todas las interacciones depredador-presa, excepto la depredación de protozoos, son de reconocida significación ecológica e incluso se considera que son los métodos más eficientes para valorar los efectos de los compuestos químicos sobre los ecosistemas. Los mecanismos que más frecuentemente se encuentran afectados por las sustancias químicas son la velocidad natatoria tanto del depredador como de la presa, es decir, la reducción de capturas por el depredador o la capacidad de fuga por parte de la presa; en el sistema de depredación pez-zooplancton, las sustancias químicas pueden también afectar la visión del pez. Como vemos, son métodos de fácil realización y con parámetros fácilmente mensurables, pero suelen tener el inconveniente de la reproductibilidad de las pruebas, problema de difícil solución, ya que son muy numerosas las variables experimentales que pueden afectar los resultados.

3.7.1.4. Métodos de interacción Huesped-Parásito

Otro tipo de método que puede emplearse en un futuro próximo en los modelos de ecosistemas acuáticos es el de interacción huésped-parásito, puesto que la incidencia del parasitismo está determinada por el estado fisiológico del huésped y se sabe que varios agentes estresantes ambientales pueden reducir la resistencia del huésped a la infestación. Así se conoce que la exposición a determinados pesticidas origina en los peces un aumento de las infestaciones parasitarias. Sin embargo, estos métodos no están todavía generalizados con la finalidad de valorar los efectos de los contaminantes químicos.

3.7.1.5. Método de Simbiosis

En los modelos de ecosistemas terrestres se considera que un buen método de estudio para valorar los efectos de las sustancias químicas puede ser la simbiosis, principalmente el modelo leguminosa-rizobio, en el cual los parámetros que hay que considerar pueden ser el crecimiento medio de las plantas, peso de éstas, número y peso de los acodos, frecuencia de la floración, longitud del tallo, síntomas de enfermedad y contenido en nitrógeno.

3.7.2. Estudios de los procesos del Ecosistema

3.7.2.1. Modelos Acuáticos

Entre los métodos basados en la investigación de los procesos de los ecosistemas, en los modelos de ecosistemas acuáticos disponemos de los estudios sobre comunidades de perifiton (nombre con que se conoce la comunidad de organismos unidos o asociados con los substratos bentónicos o las superficies sumergidas de los macrofitos, que incluyen bacterias, algas y algunas especies de invertebrados), centros de sedimentos y modelos de microcosmos de estanques. En conjunto se consideran como los modelos de más porvenir en la valoración de los efectos de las sustancias químicas sobre los ecosistemas ya que en ellos pueden reproducirse fácilmente las condiciones naturales, son estables, reproducibles, fácilmente manipulables y con suficiente complejidad biológica. En ellos se pueden emplear como parámetros la producción y consumo de gases, la descomposición de la materia orgánica, la nitrificación y la desnitrificación.

3.7.2.2. Modelos Terrestres

En los modelos de ecosistemas terrestres se estudian sus procesos básicos, es decir, el ciclaje de nutrientes y la captación y transferencia de energía, propiedades que pueden ser afectadas por las sustancias químicas ya que las concentraciones alcanzadas por ellas pueden alterar la composición química de los suelos.

Entre los parámetros más estudiados en ellos se encuentran los que a continuación se indican:

1.- La producción primaria. Así, en bosques y producción agrícola puede detectarse por la captación de CO₂, los síntomas de enfermedades como clorosis y necrosis, el tiempo de floración, el estado de nutrición de las hojas, etc.

2.- El ciclaje de nutrientes, principalmente el nitrógeno y el azufre (siendo sencillo determinar la movilización del nitrógeno midiendo su contenido), y las concentraciones de calcio y de nitratos.

3.- El metabolismo comunitario, que puede valorarse por la medición del flujo de CO₂, puesto que se sabe que las sustancias químicas pueden deprimir o aumentar dicho flujo. En general se puede enunciar que los toxicantes persistentes lo deprimen, mientras que las sustancias químicas que sirven como sustrato lo elevan y los toxicantes no

persistentes originan una depresión inicial seguida de una fuerte elevación y un lento retroceso a los valores originales. Otro parámetro que puede emplearse para determinar el metabolismo comunitario puede ser el consumo de oxígeno, el cual no se considera tan preciso como el citado eflujo de anhídrido carbónico. También puede emplearse la concentración de ATP y la actividad enzimática del modelo, pero ambos parámetros resultan más complicados de valorar y son métodos más indirectos que la medición del eflujo de CO₂.

Aunque, al parecer, se ha determinado que los metales pesados son los únicos tóxicos que afectan sensiblemente el metabolismo comunitario del suelo a concentraciones que seguramente no afectan a muchos organismos individuales, los estudios realizados con pesticidas indican que los microorganismos del suelo y los procesos originados por ellos en los ecosistemas son típicamente menos sensibles a los toxicantes químicos que las poblaciones y organismos individuales.

3.7.3. Modelos Matemáticos

Los modelos matemáticos, pueden considerarse, al igual que los modelos de sistemas de laboratorio, como análogos a los ecosistemas naturales (Jeffers, 1991). Sin embargo, no son intercambiables, ya que los modelos de sistemas están compuestos de organismos reales y los modelos matemáticos consisten meramente en representaciones matemáticas de organismos. No obstante, modelos similares de un mismo ecosistema pueden producir predicciones totalmente diferentes sobre la respuesta al tóxico químico, siendo la validez del modelo el principal problema existente en el campo de la modelación ecológica. En la actualidad, los modelos matemáticos se encuentran en período de desarrollo, sobre todo enfocados a predecir los efectos de los tóxicos sobre los ecosistemas. En ecología, los modelos matemáticos utilizados pueden encuadrarse en tres tipos: modelos de simulación de ecosistemas, modelos de multiplicación generalizada y modelos de metodología alternativa.

3.7.3.1. Modelos de simulación de Ecosistemas

Los modelos matemáticos de simulación de ecosistemas son los que incorporan mayor representación de los procesos bióticos y abióticos, pero tienen el inconveniente de poseer una necesaria complejidad.

3.7.3.2. Modelos de Multipoblación Generalizada

Los modelos de multipoblación generalizada no incorporan el fenómeno del transporte, por lo que pueden emplearse para predecir los efectos de las sustancias químicas sobre los ecosistemas, pero no sirven para predecir el destino de estas sustancias. No parecen apropiados para valorar los efectos de los toxicantes químicos sobre los ecosistemas.

3.7.3.3. Modelos de Metodología Alternativa

Los modelos que emplean metodologías alternativas parecen potencialmente útiles para valorar los peligros de los compuestos químicos, ya que dos de ellos, el análisis de curvas y el análisis del tiempo medio, son métodos para el análisis de calidad de conducta de sistemas de ecuaciones diferenciales aparejadas, mientras que un tercero, el análisis *input-output*, es un método de análisis econométrico que ha sido modificado para su uso en ecología (Guthrie y Perry, 1980; Jeffers, 1991).

3.7.4. Uso de Bioindicadores

3.7.4.1. Cultivos y Líneas Celulares

Debido a la utilización masiva de animales de experimentación para el estudio de enfermedades y la valoración e investigación de infinidad de sustancias, la Unión Europea mediante sus directivas, está potenciando el uso de técnicas alternativas al uso de estudios realizados "in vivo".

Los cultivos celulares son unas técnicas de detección rápida y sensible que se comportan como biomarcadores celulares y nos permiten evaluar "in vitro" lo anteriormente citado.

El cultivo de células, tanto de animales como de vegetales, pueden ser muy valiosas en el estudio de contaminantes, especialmente, de contaminantes cancerígenos (de la Peña et al., 1997)

Existen numerosos métodos "in vitro" que permiten evaluar la toxicidad y que pueden estar fundamentados sobre la determinación de la viabilidad celular o sobre las perturbaciones del crecimiento. Esto conduce a calcular la Dosis Inhibitoria media (DI₅₀) que es el equivalente de la Dosis Letal media (DL₅₀) en toxicología animal (Fry et al., 1990).

Según la terminología de la Asociación Americana de cultivo de tejidos, el concepto de cultivo celular es el mantenimiento fuera del organismo de células no organizadas en tejidos, pero capaces de dividirse y experimentar "in vitro" un metabolismo y funciones específicas (Shaefer, 1979)

3.7.4.2. Biosensores y Biomarcadores

Los **Biosensores** son organismos vivos que manifiestan una respuesta ante la presencia de un contaminante; las características de estos organismos vivos son muy diferentes ya que su origen también es muy diverso. El **Biomarcador** será la parte integrante del organismo vivo que aislada o no, responde ante la acción del contaminante.

3.7.4.3. Animal Centinela y Animal Filtro

El Animal centinela se puede definir como la especie animal que puede informar de forma rápida al profesional de los efectos que tienen los polutantes sobre ellos. Son unos biosensores primarios.

Se ha observado que los animales son perfectos indicadores de la calidad del aire; así se comprueba que algunas variedades de lepidópteros sufren una brusca selección en una zona cuando se instala una industria contaminante, o se presenta una masiva mortalidad de abejas en la zona de influencia de las fábricas de aluminio. Esta desaparición de insectos provoca la eliminación conjunta de animales insectívoros, por ejemplo la desaparición de vencejos en Madrid. Según parece, el mecanismo de acción de los polutantes sobre los animales es doble: por un lado, la agresión directa y, por otro, la ingestión de vegetales impregnados de estos polutantes, como en el caso del flúor. La cantidad de flúor contenido en las plantas es un perfecto indicador de contaminación; el pino silvestre es extremadamente sensible a esta contaminación pudiendo llegar incluso a su destrucción.

También podríamos citar como animales indicadores de los polutantes, a los animales salvajes, como liebres, corzos, ciervos, etc., en los que se han observado lesiones que se atribuyen a los contaminantes aéreos, trastornos que llegan a su máxima expresión en los animales salvajes de los parques zoológicos (Capó, 1998).

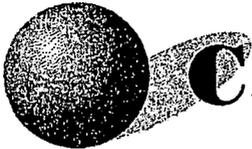
En la actualidad se está empezando a utilizar el concepto de **animal filtro** que es aquel que, por sus características fisiológicas y/o metabólicas, retiene el tóxico

evitando que llegue al hombre (por ejemplo, los rumiantes que retienen los metales pesados). Estos procesos son conocidos pero no se manifiestan, por ello no podemos clasificar a los animales filtro junto con los centinela (Anadón y Capó, 2001).

3.8. REFERENCIAS

1. Anadón Baselga MJ; Capó Martí MA. Métodos de Evaluación en Ecotoxicología. Madrid. 2001. 82 pp.
2. Brown RM; Mc Clelland NI; Deiniger RA; O'Connor MF. A water quality index-crashing the psychological barrier. En Thomas, W.A. (Ed.). Indicators of Environmental quality. 1972. 173-182.
3. Capó Martí MA. Empleo de Biomarcadores celulares en Neurotoxicología Medioambiental. Tesis Doctoral, Alcalá de Henares, 1998.
4. Capó MA; Borregón S; Peribáñez E; Jover A y Palencia M. Uso de bioindicadores, prevención y cuantificación experimental de procesos ecotoxicos. Ciencias Veterinarias. 1998 Mayo; pp. 47-56.
5. Ederra Induráin A. Botánica Ambiental Aplicada. Ed. Universidad de Navarra, S.A. (EUNSA). Navarra, 1996.
6. Filip DS; Peters T; Adams VD; Middlebrooks EJ. Residual heavy metals removal by an algae-intermittent sand filtration system. *Water Res.* 1979, 13: 305-313.
7. de Filippis LF; Pallaghy CK. Heavy Metals: Sources and Biological Effects. *Advances in Limnology.* 1994, 42: 31-77.
8. Fry JR; Garle MJ; Hammond AH; Hatfield A. Correlation of acute lethal potency with in vitro cytotoxicity. *Toxic. in Vitro.* 1990, 4 (3): 175-178.
9. Gilbert N; Gutierrez AP; Frazer BD; Jones RE. Relaciones ecológicas. Ed. Blume. Barcelona, 1981.
10. Guthrie FE; Perry JJ. Introduction to Environmental Toxicology. Ed. Elsevier. New York, 1980
11. Jeffers JNR. Modelos en Ecología. Ed. Oikos-tau. Barcelona, 1991.
12. Luque MD. Biosensores en el seguimiento de la contaminación ambiental: ¿Panacea o fraude?. *Técnicas de LABORATORIO.* 1997; 219 (3): 122-124.
13. Moriarty F. Ecotoxicology. Ed. Academic Press. London, 1983.
14. de la Peña E; Guadaño A; Repetto G. Ensayos alternativos a la experimentación animal. *Animal Exp* 2 (3): 30-35.

15. Persoone G; Van de Vel A; Van Steertegem M; De Nayer B. Predictive value of laboratory test with aquatic invertebrates: Influence of experimental conditions. *Aquatics Toxicol.*, 1989. 14: 149-166
16. Podani J. Biological indication at the community and ecosystem levels. En Kovács, M. (Ed.). *Biological indicators in environmental protection.* 1992, 19-34.
17. Schaefer WI. Proposed usage of animal tissue culture terms. Usage of vertebrate cells, tissue and organ culture terminology. *In vitro.* 1979, 15: 649-653.
18. Seoanez Calvo M. (1996): *Gran Diccionario Medio Ambiente y Contaminación.* Ed. Mundi Prensa.
19. *Vocabulario Científico-Técnico.* R. Acad. CC Exactas, Físicas y Naturales. Ed. Espasa. 1996.



CAPÍTULO 4

4.METODOLOGÍA Y TRATAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

4.1. METODOLOGÍA DE FORMATO Y ESPECÍFICA.

Dado el número de posibles bioindicadores utilizados (siete) y en orden a facilitar la lectura se ha optado por un formato de capítulos botánicos y animales, detallándose las metodologías específicas en el correspondiente capítulo.

4.2. SOPORTE BIBLIOGRÁFICO: BÚSQUEDA.

Las herramientas principales de búsqueda bibliográfica han sido :

- Medline
- Vet-CD
- Internet

Para la recopilación de las referencias citadas se han consultado las bibliotecas disponibles y, en el intento de lograr mayor información al respecto, realizado paralelamente visitas personales a autoridades científicas de los siguientes Centros:

- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
- Museo de Ciencias Naturales
- Facultades de Veterinaria, Medicina, Ciencias Biológicas, Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad Complutense
- Facultades de Ciencias Ambientales y Ciencias Geológicas de la Universidad de Alcalá de Henares
- Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos
- Laboratorio Arbitral del Ministerio de Agricultura

El trabajo se apoya en un total de 203 referencias.

4.3. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

4.3.1. Definición de las variables

- **Bioindicador:** Variable cualitativa compuesta de 1 a 4 categorías nominales en función de los potenciales bioindicadores botánicos o animales implicados y codificada numéricamente.
- **Concentración:** Representa las diferentes concentraciones de MeHg ([MeHg]) en partes por millón (ppm). La concentración 0 ppm, ha sido utilizada como categoría de referencia (control). La variable ha sido definida, en función de su aplicación, bien como variable ordinal (análisis de regresión) o como cuantitativa discreta (análisis de correlación).
- **Germinación:** Variable cualitativa binaria nominal que representa botánicamente el estado germinal de la semilla (codificación : 0 = germina; 1 = no-germina)
- **Altura:** Variable cuantitativa continua, expresada en mm, que representa la altura alcanzada por el tallo de la planta.
- **Fototaxia:** Variable categórica binaria nominal que representa la presencia o ausencia de respuesta fototóxica en el zooplancton (codificación: 0 = si; 1 = no).
- **Altura media:** Variable cuantitativa continua que expresa la altura media alcanzada por las plantas en mm.
- **Porcentaje de no-germinación:** Variable cuantitativa continua que expresa el porcentaje de plantas no germinadas en una concentración concreta (%).
- **Tiempo de vida:** Variable cuantitativa continua que expresa el tiempo de vida de un animal en días.
- **Status:** Variable cualitativa binaria que representa zoológicamente el estado de vida o muerte (codificación: 0 = vive; 1 = muere).

4.3.2. Procedimiento estadístico

Se realiza el estudio descriptivo de los datos presentando cuantitativamente los valores medios y sus medidas de centralización/dispersión (media, desviación o error típico / intervalos de confianza) y cualitativamente mediante la presentación, numérica o mediante histograma, de frecuencias/porcentajes.

Para todos los parámetros estimados se estableció un intervalo de confianza del 95%. Las pruebas estadísticas se efectuaron para dos colas.

Para el estudio de inferencia y asociación/correlación se han aplicado los siguientes estadísticos:

4.3.3. Estadísticos aplicados

- Para el estudio de más de dos muestras con variable dependiente cuantitativa y tras aplicar la prueba "a priori" de **Kolmogorov-Smirnoff** (estadístico que contrasta la bondad de ajuste a una distribución gaussiana normal y condiciona las características paramétricas o no paramétricas de los estadísticos a aplicar) se utilizó el estadístico ANOVA o análisis de varianza de **Fisher** para uno o varios factores (permite analizar el comportamiento de la variable dependiente en función del factor/factores determinado/s por las categorías de la/s variable/s independiente/s tras la obtención del valor F de **Snédecor**). Tras la evaluación del resultado del estadístico, asimismo "a priori", de **Levene** (contrasta la hipótesis nula de que las varianzas de una variable y en n subpoblaciones no difieren significativamente, condicionando la aplicación de otros estadísticos "post-hoc" para evaluar las diferencias pareadas inter-grupos), se analizan las diferencias intergrupo mediante la prueba de **Tahmane** (método "post-hoc" del análisis de varianza para el estudio de las diferencias intergrupos cuando las varianzas no son homogéneas).

- Para el estudio de muestras de dos subpoblaciones con medición de una variable cuantitativa se ha aplicado el test t no pareado de **Student** (contrasta la hipótesis nula de que no hay diferencia entre la media del valor numérico de las dos subpoblaciones) con corrección de **Welch** si las varianzas eran heterogéneas.

- Las correlaciones lineales entre variables se analizaron mediante regresión lineal simple (obtiene una función lineal de la variable independiente sobre la dependiente cuando ambas se ajustan a una distribución normal), determinación de los coeficientes de

correlación de **Pearson** (estima la asociación lineal entre los valores de variables medidas en escala de razón o de intervalo ajustadas a una distribución normal) y coeficiente de determinación (estima la proporción de variabilidad de la variable dependiente debida al efecto de la independiente).

- Para el análisis de variables independientes dicotómicas en función del tiempo se ha aplicado el estadístico de supervivencia **Kaplan-Meier** (estima, en función del tiempo, la probabilidad de que ocurra un evento categorizado como binario), con o sin estratificación para un factor concurrente, comparándose las curvas de supervivencia acumulada en los diferentes subgrupos mediante el estadístico de **Breslow** (prueba basada en el test t-pareado para el análisis de las diferencias entre curvas obtenidas por Kaplan-Meier).

- Las diferencias de proporciones entre grupos se han estudiado mediante tabla de contingencia y chi-cuadrado (χ^2) de **Pearson** con corrección de **Yates** o estadístico exacto de **Fisher** en función del número de elementos en las celdas de la tabla. Cuando se precisaron, para un análisis conjunto, múltiples tablas de contingencia 2x2 se consideraron sus significaciones a través de la p corregida de **Bonferroni**.

4.3.3.1. Análisis de bio-riesgos

El estudio de bio-riesgos se ha realizado mediante:

1.- Regresión logística de pasos hacia delante (las variables asociadas significativamente con el factor de riesgo son introducidas secuencialmente en función de su eficacia estadística y grado de aporte a la mejor significación del modelo) con construcción de modelos predictivo / explicativo de la probabilidad de aparición (P_{evento}) de un determinado evento, expresados por el exponente Z de forma que:

$$P_{\text{evento}} = 1 / (1 + e^{-Z})$$

Siendo:

$$Z = (\beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_n x_n)$$

Los coeficientes β son los parámetros desconocidos a estimar y que toman diferentes valores para cada variable. A partir de Z se consideran las probabilidades de pertenecer a uno de los grupos establecidos por las categorías de la variable dependiente dicotómica. El método ha sido por máxima verosimilitud (puntuación eficiente de Rao). Los criterios de entrada de variables ha sido de $p < 0.05$ y el de salida $p > 0.10$. El manejo de variables cualitativas se realizó mediante la creación de $(n_{\text{categorías}} - 1)$ variables enmascaradas ("dummy") que fueron contrastadas contra una categoría de referencia (ppm de MeHg = 0 y bioindicador de menor riesgo). Se han determinado los odds-ratios (OR) crudos o ajustados (OR_{aj}), con sus intervalos de confianza (IC 95%), en función de que el estudio fuese bi o multivariado). Un odds-ratio representa el número de veces más de riesgo de un evento en presencia a) de un factor cualitativo frente a su ausencia o b) al incrementar en una unidad el valor de un factor cuantitativo. Con las predicciones obtenidas se han construido matrices de clasificación para los diferentes puntos de corte, en busca del de mayor eficacia clasificatoria, y se ha calculado la curva de características diagnósticas (ROC) y el área bajo ella (W de Wilcoxon).

2.- Regresión de riesgos proporcionados de Cox. Procedimiento similar al anterior que a partir de una función Z específica, estima la probabilidad de que un evento no ocurra hasta pasado un tiempo $(t + \Delta t)$ obteniendo un modelo de riesgos relativos proporcionados. El valor Z para la función de riesgo de Cox equivale a:

$$Z = (\beta_1 x_1 + \dots + \beta_n x_n)$$

Siendo los coeficientes β los parámetros desconocidos a estimar y que toman valores distintos para las variables. Proporcionando el riesgo relativo ajustado (RR_{aj}) permite estimar a su través, el mayor número de probabilidades de que aparezca el evento en presencia de un factor de riesgo que en su ausencia con independencia de la presencia o ausencia de los restantes factores.

Los modelos obtenidos y su significación, se presentan mediante la correspondiente tabulación y/o formulación matemática.

4.3.3.2. Análisis de la capacidad biomedidora

El análisis de las capacidad biomedidora se realizó mediante regresión lineal simple con evaluación de los coeficientes de determinación tras analizar el ajuste del modelo a diferentes curvas y/o mediante regresión múltiple de pasos sucesivos (stepwise) sobre criterio de entrada de variables $p < 0.05$ y de salida $p > 0.10$. Frente a otros métodos permite la ventaja de que una variable seleccionada en un paso pueda ser eliminada en otro posterior.

4.3.3.3. Soportes informáticos

Para el proceso estadístico general de los datos se ha utilizado el paquete estadístico SPSS 8.0 complementando con una hoja de cálculo Excel v.98 ambos para Windows.

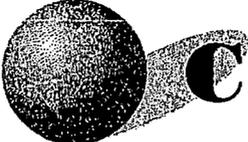
Los gráficos han sido realizados mediante Power Point para Windows y Corel Draw 7.

En los dibujos se han utilizado: Paint Sho Pro, Corel Chart , Corel Photo-Pain y ThumbsPlus 3.0 para Windows y para las fotografías VideoKit.

Las fotografías y dibujos, sin citación nominal específica, son originales.

4.4. REFERENCIAS

1. Camacho Rosales J. Estadística con SPSS para Windows. Ed. Ra-Ma. Madrid, 2000.
2. Carrasco JL. El método estadístico en la investigación médica. Ed. Ciencia 3, SA. Madrid, 1986.
3. Concato J. Feinstein AR, Holford TR. The risk of determining risk with multivariable models. An. Intern. Med 1993; (118): 201-210
4. Ferrán Aranaz M. SPSS para Windows. Programación y análisis estadístico. Ed. Mc Graw-Hill. Madrid, 1997.
5. Ferrán Aranaz M. SPSS/PC V.5.0. Ed. Dykinson. Madrid, 1994..
6. Hanley J.A. McNeil B.J.. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. Radiology 1982; (143): 29-36
7. Katz MH. Multivariable Analysis. A practical guide for clinicians. Ed. Cambrige U.P. New York, 1999
8. Millán C. Epidemiología para clínicos. Medicina Clínica. 96, (10), 1991.
9. Martín Andrés A; de Luna J. Bioestadística para las Ciencias de la Salud. Ed. Norma SA. Madrid, 1988.
10. de la Puente C. SPSS/PC. Una guía para la investigación. Ed. Complutense. Madrid, 1993



CAPÍTULO 5

5.EXPERIMENTACIÓN VEGETAL

5.1.GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

Por germinación se entiende el conjunto de fenómenos que inducen el paso de las semillas de un estado de vida latente a uno de vida activa, dando así origen a una nueva plántula. A fin de que pueda producirse es necesaria la existencia simultánea de ciertos factores favorables internos y externos.

5.1.1. Factores internos

Las partes fundamentales de una semilla son el embrión y las sustancias de reserva, que están contenidas en los parénquimas de los cotiledones (hojitas embrionarias) o bien en los parénquimas que constituyen el albumen. Externamente a esas estructuras se encuentran los tegumentos seminales.

La posibilidad de germinar depende de la perfecta conformación del embrión y de la suficiente cantidad de sustancias de reserva. Estas condiciones tienen una probabilidad tanto mayor de cumplirse cuanto mejores sean las condiciones generales y de nutrición de la planta madre.

Otro factor indispensable es la maduración morfológica y fisiológica de la semilla. En muchas especies, este estadio coincide con la maduración del fruto y, en el caso concreto de los frutos secos, con la dehiscencia.

Algunas semillas adquieren la madurez fisiológica, es decir, la capacidad de germinar, antes de haber alcanzado la morfológica, a veces incluso antes de la maduración del fruto (ej.: Leguminosas y Gramíneas).

El caso opuesto son las semillas que, maduras ya morfológicamente, tienen necesidad, para alcanzar la madurez fisiológica, de una diapausa, es decir, de un período variable de pocos días a algunos meses, de maduración interna (10 días para *Caltha palustris*; 10 meses para *Corydalis cava*).

Más extremo es todavía el caso de las semillas (ej.: peral y melocotonero) que

requieren un periodo de postmaduración en el cual se producen, en la semilla morfológicamente ya madura, transformaciones químicas complejas, que permiten al embrión utilizar las sustancias de reserva. Durante el proceso de postmaduración son destruidas las sustancias inhibitoras de la germinación, a las cuales se da el nombre genérico de blastocolinas, y que pueden estar contenidas en el albumen y a veces en los tegumentos seminales. El fenómeno ha sido especialmente estudiado en las cariápsides del trigo.

La naturaleza química de estos inhibidores es muy variable; a menudo se trata de sustancias relativamente simples, como derivados fenólicos, la gran mayoría eliminables mediante prolongados lavajes en agua.

Otro factor característico de la semilla es la vitalidad, o sea la posibilidad de germinar durante cierto período de tiempo, variable según las especies: desde pocos días (álamos y sauces), o pocos meses (haya), a años (10 para el centeno). Además de las condiciones ambientales externas de conservación de las semillas, esa vitalidad depende también del tipo de sustancia de reserva; en general, las semillas con reservas oleíferas pierden fácilmente la capacidad germinativa, mientras que pueden durar más tiempo las que tienen reservas amiláceas.

5.1.2. Factores externos

Los factores externos más importantes son el agua, el oxígeno, la temperatura y la luz.

El agua es indispensable, puesto que provoca la imbibición y dispersión de los coloides plasmáticos, participa en la reactivación de los enzimas respiratorios y de los que realizan la lisis de las sustancias de reserva. Por otra parte, actúa sobre los tegumentos seminales favoreciendo su ruptura. Las semillas con tegumentos impermeables al agua requieren, para su germinación, una larga permanencia en el suelo, donde se modifican por acción de las floras bacteriana y fúngica.

Otra sustancia de fundamental importancia es el oxígeno; durante la inhibición de las semillas, los procesos respiratorios, al principio muy lentos, se han acentuado hasta alcanzar el máximo cuando la plántula aflora del tegumento. No obstante, existen excepciones, representadas por semillas que germinan mejor en ambientes asfícticos, como por ejemplo las semillas de plantas acuáticas (la castaña de agua, *Trapa natans*; la espadaña, *Typha latifolia*, y la ninfea, *Nymphaea*).

La presencia de agua y de oxígeno no es suficiente para la germinación si las condiciones de temperatura no son favorables. Esta varía para las distintas especies; para muchas plantas se conocen los intervalos de temperatura dentro de los cuales germinan, datos que resultan muy útiles para la elección de la época de siembra y de los tipos de cultivo adaptados a los caracteres propios de la zona de que se trate.

Desde un punto de vista trófico, la luz no es importante para este fenómeno, ya que durante dicho período la semilla se desarrolla a expensas de las sustancias de reserva, pero puede constituir un factor determinante para el cese del estado latente. Considerando su sensibilidad a la luz, las semillas pueden dividirse en categorías: indiferentes, fotoblásticas y afotoblásticas.

Las semillas **indiferentes** son las que no se resienten por las condiciones de iluminación; y aunque son una minoría, revisten interés económico porque comprenden los cereales y las legumbres.

En cambio, la germinación de las semillas **fotoblásticas** es estimulada por la luz; a esta categoría pertenecen cerca del 70 % de las especies estudiadas. Muchas de esas semillas no germinan a la obscuridad, y en la Naturaleza lo hacen sólo cuando el día está ya avanzado (ej.: géns. *Viscum*, *Lactuca* y *Poa*). Para las semillas **afotoblásticas** la luz es un factor inhibitorio o, por lo menos, retardador (ej.: tomate y estramonio).

5.1.3. Utilización de las sustancias de reserva

Producida la germinación, el embrión crece y se transforma en una nueva plántula, utilizando para ese fin los materiales de reserva de que dispone, representados comúnmente por polisacáridos (almidón), lípidos y proteínas, que pueden encontrarse asociados en la misma semilla o no.

La utilización de los materiales nutritivos se efectúa por vía enzimática y se inicia con procesos de hidrólisis que conducen a la escisión de las moléculas complejas. Muchos de esos fenómenos de lisis son observables al microscopio; por ejemplo, en los gránulos de almidón de las cariósides aparecen, durante el crecimiento de la plántula, figuras de erosión cada vez más acentuadas a medida que progresa el proceso digestivo.

En las semillas sin albumen, en las cuales las sustancias de reserva están acumuladas en los cotiledones, son hidrolizadas por acción de los enzimas producidos por las propias células. En las semillas con albumen, si las reservas son lipídicas, las células

que las contienen están aún vivas, y por tanto son capaces de producir enzimas hidrolíticos; si las reservas son amiláceas (ej.: en las gramíneas), las células están prácticamente muertas, y por tanto carecen de enzimas, por lo que son incapaces de llevar a cabo la digestión interna de las sustancias. En este caso se produce una digestión externa: las células que constituyen la capa exterior del albumen y que, al carecer prácticamente de almidón y contener abundantes sustancias proteicas, conservan las características vitales, producen enzimas amilolíticos y proteolíticos que inician la digestión del albumen.

No obstante, la mayor parte de esos enzimas es producida y secretada por las células de la epidermis del escutelo (cotiledón), que dirige la verdadera digestión de la carióspside. Los productos de la hidrólisis son luego absorbidos por el escutelo, que los cede a las demás partes del embrión en proceso de crecimiento. A medida que la plántula crece, el escutelo ve cada vez más disminuida su vitalidad y acaba por morir.

Durante la germinación, todos los enzimas que dirigen el metabolismo (respiración, síntesis, etc.) incrementan su actividad. Esto puede ser la consecuencia de los fenómenos de reactivación en las primeras fases de la germinación y luego por síntesis de enzimas *ex novo*.

Las sustancias derivadas de los procesos de hidrólisis de los materiales de reserva de la semilla son las materias primas básicas para los procesos de síntesis que conducen al crecimiento del embrión para la formación de la plántula.

5.1.4. Crecimiento de la planta

En el contexto vegetal se entiende por crecimiento en sentido estricto el aumento irreversible de volumen acompañado de producción de nueva sustancia seca, o bien de variaciones estables de las células y del organismo. Se excluye cualquier aumento debido a la captación temporal de sustancias (ej.: el agua) que no entren a formar parte directa del organismo viviente. El crecimiento es determinado por un conjunto de procesos fisiológicos, cuyo resultado final es el aumento del cuerpo vegetal.

En los vegetales unicelulares, el crecimiento del organismo se identifica con el de las células; en cambio en los vegetales pluricelulares presenta dos modalidades, que no se excluyen mutuamente:

- Por aumento del número de células o **meresis**. Se produce en los

meristemas.

- Por aumento del volumen de las células o **auxesis**. Se localiza en las zonas de alargamiento situadas a cierta distancia de éstas (Stern, 2000).

La diferenciación de los tipos celulares se produce sólo durante la auxesis; esto implica que los meristemas permanezcan situados durante la vida de la planta en las zonas en las cuáles las células presentan características embrionarias (Raven et al, 1991)

Las plantas pueden acumular elementos traza en sus tejidos, especialmente metales pesados, debido fundamentalmente a su gran habilidad para adaptarse a las propiedades químicas variables del medio ambiente. Las plantas son reservorios intermedios a través de los cuales los metales del suelo, agua y aire, son transferidos a los animales y al hombre.

El suelo constituye una importante barrera para los metales pesados ya que, una vez producida la alteración, los mecanismos de liberación son muy lentos, mucho más lentos que en la atmósfera o en el agua (Kabata-Pendias et al., 1992).

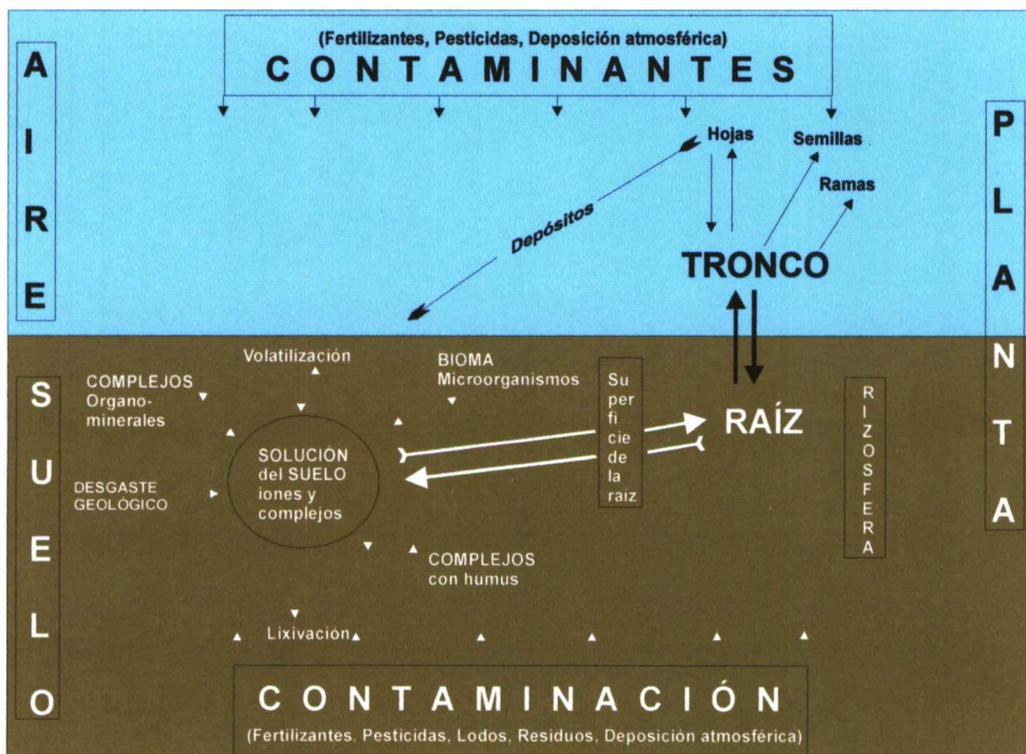


Fig. 5.1: Dinámica de los metales en el sistema suelo-planta (Basado en Alloway, 1990)

Las dos preocupaciones relevantes en relación a la presencia de los metales en los suelos son: la disponibilidad de los metales esenciales para el crecimiento de las plantas y la incorporación de metales tóxicos que pueden disminuir el crecimiento de la planta y/o ser transferidos a los animales y al hombre a través de la cadena alimenticia.

La disponibilidad de los metales generalmente está asociada con la formación de complejos metálicos con las sustancias húmicas y otros compuestos de elevado peso molecular. Los metales, una vez que forman complejos o quelatos, pueden emigrar con mayor facilidad a las capas profundas del suelo o a la atmósfera (Fig. 5-1). También pueden encontrarse como depósitos superficiales que son reducidos o eliminados por lavado u otros métodos de preparación de los alimentos. En el caso de los pastos no se produce esta eliminación, siendo ingeridos por los animales (Shacklette et al., 1978).

La incorporación de metales por las plantas se realiza principalmente desde el suelo, a partir de la fase líquida ya sea en forma iónica, complejada o quelada, a través de las raíces y está influida por numerosos factores como son el suelo (temperatura, pH, aireación, condiciones redox, fertilización), la especie vegetal, momento de su desarrollo, tamaño, sistema radicular, tiempo de exposición y efectos sinérgicos y competitivos de los metales (Fergusson, 1990; Gómez et al., 1993).

La absorción radicular de los metales puede realizarse por dos mecanismos distintos: **pasivo** o no metabólico y **activo** o metabólico (Gómez et al., 1993). La absorción pasiva consiste en la difusión de los iones de la solución externa a la raíz, mientras que la activa requiere una energía metabólica y tiene lugar contra un gradiente químico (Kabata-Pendias et al., 1992). En algunos casos, pueden afectar a la composición química de las plantas sin causar daños visibles en las mismas (Tiffin, 1979; Kabata-Pendias et al., 1992).

Además de la absorción a través de la raíz, las plantas también pueden incorporar cantidades significativas de algunos elementos mediante absorción foliar. Esta vía tiene un importante impacto en la contaminación de las plantas y, a su vez, es aprovechada en la agricultura para la aplicación de fertilizantes. Este tipo de absorción consiste en una penetración cuticular, no metabólica como vía principal y va a depender de la especie de planta, de la humedad en la superficie de las hojas y de la naturaleza de los solutos. Los elementos traza asimilados a través de las hojas pueden ser translocados a otros tejidos de la planta, incluyendo las raíces, donde se acumula el exceso de ciertos metales (Alloway, 1990). Dentro de los metales pesados presentes en la atmósfera como consecuencia de

emisiones contaminantes que son absorbidos fácilmente a nivel foliar están el Hg, Cd, Zn y Fe (Alloway, 1990; Fergusson, 1990; Gómez, 1993).

Otra fuente de contaminación por metales pesados en las partes aéreas de las plantas, además de la deposición atmosférica, es el propio suelo, debido principalmente a las salpicaduras producidas al llover (Ward & Savage, 1994).

En las zonas rurales la principal vía de entrada de los elementos metálicos es a través de la raíz, mientras que en las zonas urbanas se produce una contribución adicional mediante la absorción foliar. La importancia de la deposición atmosférica directa de los metales en las partes aéreas de las plantas también ha sido puesta de manifiesto por Rodríguez et al. (1979). Diversos autores han demostrado que parte de los metales depositados superficialmente en las hojas de los vegetales, procedentes de la contaminación aérea, pueden ser eliminados con un lavado, y esta pérdida va desde un 4% hasta un 65%, dependiendo de la especie y los elementos (Nebreda et al., 1982).

No todos los órganos de la planta tienen la misma significación en la acumulación de los metales pesados. Normalmente la raíz es el órgano de entrada y de acumulación. En la raíz hay un transporte radial hacia otras partes de la planta hasta que, en concentraciones menores, alcanzan las hojas y alteran la estructura y funcionalidad de las células fotosintéticas (Barceló et al., 1990).

Una vez que los iones han sido absorbidos, existe la posibilidad de su movimiento por toda la planta. El grado y extensión de este movimiento depende del metal implicado, del órgano de la planta y de su edad.

Un factor esencial en la dispersión de los contaminantes es la climatología y dentro de esta, son fundamentales la lluvia y el viento. La lluvia constituye un vehículo importante de deposición metálica y favorece la movilización de los mismos una vez depositados. El viento ejerce un papel importante en la dispersión de las partículas, pudiendo transportar partículas de menor tamaño a grandes distancias (Carlones, 1995).

Otros factores que influyen significativamente en la dispersión de los metales son la orografía (pendientes pronunciadas, zonas llanas) y el tipo de vegetación presente en la zona (Nebreda et al., 1982).

Las plantas pueden acumular elementos traza en sus tejidos, especialmente metales pesados, debido fundamentalmente a su gran habilidad para adaptarse a las propiedades químicas variables del medio ambiente. Son, además, reservorios

intermedios a través de los cuales los metales del suelo, agua y aire, son transferidos a los animales y al hombre.

La toxicidad de los metales pesados en las plantas se manifiesta en primer lugar en la raíz y, en concentraciones más bajas, suele alcanzar las hojas. En las plantas los síntomas más visibles de fitotoxicidad por metales pesados incluyen una reducción del crecimiento, sobre todo en las raíces, clorosis y necrosis en las hojas y, posteriormente, síntomas típicos de senescencia y abscisión. Las plantas pueden poner en juego una serie de mecanismos metabólicos y hormonales que tienden a contrarrestar la acción distorsionante de la toxicidad (Barceló et al., 1992). Se han observado diferentes grados de sensibilidad y resistencia a la toxicidad de los metales por parte de las mismas. Esto es debido a la diversidad de estrategias de protección que han desarrollado, destacando: la planta evita o excluye al metal y la planta tolera al metal.

Respecto a la legislación existente sobre contaminación de suelos, son varios los países que a lo largo de las dos últimas décadas se han preocupado de proteger este recurso mediante una política medioambiental dirigida específicamente a este apartado. La contaminación del aire y del medio acuático han sido objeto de atención preferente en todo el mundo, mientras que el interés por la contaminación del suelo aparece en tercer lugar, a pesar de que su origen es el mismo que el deterioro de los otros medios (agua y aire) y de que los tres se interrelacionan, siendo vehículos para el transporte de contaminantes entre sí y participando también los tres en la aparición de los modernos problemas ambientales (Carlosena, 1995).

La única normativa vigente en España es la Directiva de la CEE, 86/278/CEE, y el Real Decreto de transposición 1310/1990 que regula la aplicación de lodos de depuradora o residuos en la agricultura (BOE Nº 262, 1990). En esta normativa se describen los contenidos máximos de metales pesados que pueden encontrarse en los residuos para que puedan ser susceptibles de incorporación a los suelos. En segundo lugar, se establecen los valores límites de concentración de metales pesados que puede tener el suelo, según el pH, para poder ser considerado como sistema receptor de residuos. Finalmente se fijan las cantidades máximas que pueden incorporarse por año y unidad de superficie. Los metales sujetos a regulación son: Cd, Cr, Hg, Ni, Pb y Zn.

5.2. GRAMINEAE (GRAMÍNEAS)

Familia de plantas herbáceas angiospermas monocotiledóneas, anuales o perennes, raramente leñosas, generalmente con tallos cilíndricos huecos y nudos sólidos

(caña). Hojas alternas, con base envainadora, con limbo estrecho y patente. En la inserción del limbo foliar con la vaina suele haber una especie de lengüeta, la *lígula*, o, a veces, un penacho de pelos, menos comúnmente dos prominencias engrosadas o *aurículas*, una a cada lado de la juntura. Inflouescencia sencilla y espiciforme o ramificada y con las ramas a su vez ramificadas a menudo formando una *panícula*. Flores diminutas, generalmente hermafroditas y, con frecuencia, densamente agrupadas e imbricadas para formar una *espiguilla* o *espícula*, con pocas o muchas flores. Las espiguillas suelen ser pedunculadas y tienen dos brácteas exteriores estériles, escumiformes, denominadas *glumas*, que por lo general rodean parcialmente a las flores. Cada flor consiste en una bráctea externa o *lema*, y otra interna más tenue, la *pálea*, tres estambres, raras veces uno o dos, y un ovario súpero, unilocular, con dos estilos plumosos. Espículas a menudo con flores estériles o masculinas a la vez que flores fértiles. Fruto con una sóla simiente soldada al pericarpo (*cariopsis*) (Polunin, 1974).

Las gramíneas constituyen una gran familia que con frecuencia domina grandes extensiones, particularmente en las regiones esteparias más áridas de nuestra región, y en los pastos y prados que quedan por encima de la línea del bosque en las montañas. Comprende más de 100 géneros y más de 450 especies en nuestro territorio (Polunin y Smythies, 1977).

Se da el nombre de "cereal" a aquellos miembros de las gramíneas que se cultivan para aprovechar su semilla. En esencia, los granos de cereales son concentrados de carbohidratos, el principal de los cuales es el almidón, que se encuentra en su mayor

parte en el endospermo (Fig. 5.2). El contenido en materia seca del grano depende del método que se siga para la recolección y de las condiciones de almacenamiento, pero por general es del orden de 800-900 g/kg.

De los componentes nitrogenados, un 85-90% es en forma de proteínas.

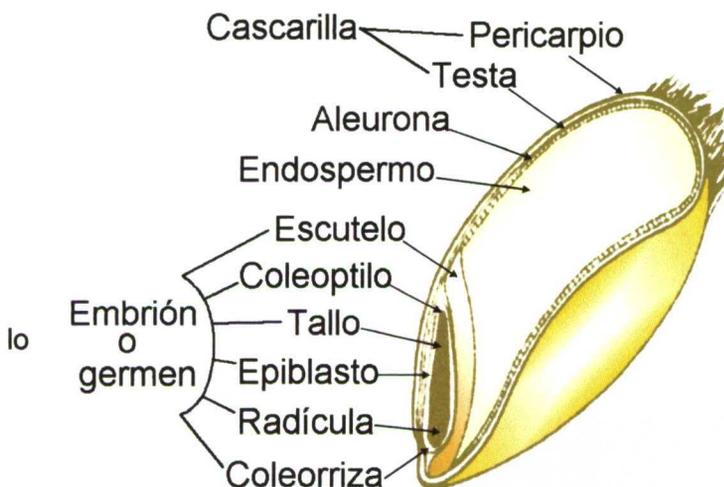


Fig. 5.2: Sección longitudinal del cariósido (grano) (Basado en McDonald, 1986)

Estas se encuentran en todos los tejidos de los granos de cereales, aunque las mayores concentraciones están en el embrión y la capa de aleurona, siendo menores en el endospermo, el pericarpio y la testa. En el endospermo la concentración de proteína aumenta desde el centro a la periferia. En el grano, el contenido total de proteína es muy variable, oscilando entre 80 y 120 g/kg. La proteína de los cereales es deficiente en algunos aminoácidos esenciales, especialmente la lisina y la metionina.

El contenido en aceite de los granos de cereales varía con la especie. El embrión o "germen" contiene más aceite que el endospermo. Los aceites de los cereales son insaturados, siendo los principales ácidos el linoleico y el oleico, y debido a ello producen una grasa corporal blanda que tiende a enranciarse con facilidad. Esto ocurre sobre todo con el maíz y la avena, que contienen doble cantidad de aceite que la cebada y el trigo.

El contenido en fibra bruta del grano cosechado es más alto en los que, como la avena o el arroz, tienen una cubierta formada a partir de la glumilla interna y externa, y más bajo en los granos "desnudos", como el trigo o el maíz.

En el endospermo se encuentra el almidón en forma de gránulos, cuya forma y tamaño varía en las diferentes especies. El almidón de los cereales está formado por un 25% de amilosa y un 75% de amilopectina, aunque en los almidones "cerosos" la cantidad de esta última es algo mayor.

Todos los cereales son deficientes en calcio, del que contienen menos de 1.5 g/kg. El contenido en fósforo es algo mayor, de 3-5 g/kg, aunque parte de este porcentaje está en forma de filatos. Los filatos de los cereales tienen la propiedad de inmovilizar el calcio de la dieta y probablemente el magnesio; en este aspecto son más efectivos los filatos de la avena que los de la cebada, centeno o trigo.

Los granos de cereales son deficientes en vitamina D y, a excepción del maíz amarillo, en provitamina A. Son buenas fuentes de vitamina E y tiamina, pero tienen poca riboflavina. La mayor parte de las vitaminas se encuentran en el germen y en la capa de aleurona (McDonald, 1986).

5.2.1. *Hordeum vulgare* (Cebada)

Gramínea con espigas densas, provistas de aristas largas, caracterizada por su fluorescencia espiciforme con cuatro carreras, de 6-10 cm, con espículas dispuestas

en cuatro filas longitudinales, todas fértiles; glumas y lemas con largas aristas de hasta 10 cm. Muy cultivada en Europa, raramente naturalizada (Polunin, 1974).

La cebada ha sido siempre un grano muy popular en la alimentación animal, especialmente para cerdos. En la mayoría de las variedades de cebada el grano está rodeado de una cubierta que constituye un 10-14 % del peso del grano.

El contenido en proteína bruta del grano de cebada oscila entre 60 y 140 g/kg, con valores medios de 90-100 g/kg. Esta proteína es, como la de todos los granos de cereales, de baja calidad, siendo especialmente deficiente en lisina. Recientemente se han producido, mediante selección, mutantes de cebada de alto contenido en lisina. El contenido en aceite es pequeño, generalmente menor de 20 g/kg.

5.2.1.1. Subproductos de la cebada

5.2.1.1.1. Subproductos de la industria cervecera

Los subproductos que se obtienen en la fabricación de la cerveza son:

- **Gérmenes de malta:** formados por la plúmula y la radícula de la cebada. Son relativamente ricos en proteína (alrededor de 240 g/kg de la proteína bruta). A pesar de todo, no son un alimento muy energético. Absorben rápidamente el agua y para que no se hinchen en el estómago de los animales, se acostumbra a humedecerlos antes de emplearlos.

- **Pulpa de cervecería:** formada por el residuo insoluble que queda después de separar el mosto. Cuando está seca contiene alrededor de 180 g/kg de proteína bruta y 150 g/kg de fibra bruta, aunque su composición varía según la cantidad y naturaleza de los aditivos empleados.

- **Lúpulo agotado:** es un producto fibroso. Hoy en día apenas se utiliza como alimento para animales y la mayoría se comercializa como abono.

- **Levadura de cerveza:** es un concentrado rico en proteína, que contiene alrededor de 420 g/kg de proteína bruta y es una valiosa fuente de todas las vitaminas del complejo B. Su contenido en fósforo es relativamente alto y es pobre en calcio.

5.2.1.1.2. Residuos de destilería y solubles de destilería

Procedentes de las destilerías de whisky que pueden ser, bien del tipo de

“malta” o del tipo de “residuos”. En las primeras solamente se emplea malta de cebada, mientras que en las segundas emplean una mezcla de cereales que puede incluir cebada, maíz, trigo y avena. Su composición es muy variable y dependerá de los materiales de partida. La composición de los residuos de la destilería de malta no varía tanto y contiene unos 200-280 g de proteína bruta por kg de materia seca, 160-210 g de fibra bruta y 50-80 g de lípidos. Son pobres en minerales solubles, sodio y potasio, y en calcio.

5.2.1.1.3. Subproductos de la industria de la cebada perlada

En la preparación de la cebada perlada para consumo humano se separa el salvado y el grano mondado se pule hasta dejarlo blanco y brillante. Durante este tratamiento se obtienen tres subproductos, conocidos como polvo basto, medio y fino, que a menudo se mezclan y se venden como pienso de cebada. Este alimento contiene aproximadamente 130 g/kg de proteína bruta y 90 g/kg de fibra bruta (McDonald, 1986).

5.2.2. Zea mays (Maíz)

Gramínea anual, muy robusta, de hasta 5 metros, con tallo recio y con muchas hojas anchas, con inflorescencia terminal plumosa de espículas masculinas, con varias inflorescencias laterales femeninas, grandes, a modo de yemas, estrechamente vestidas de brácteas foliáceas e imbricadas. Espículas masculinas de 6-8 mm, apretadas a lo largo de muchas ramas finas; espículas femeninas densamente agrupadas sobre una rama lateral gruesa, completamente cubiertas de brácteas, con sólo los estilos, de 12-20 cm de longitud, sobresaliendo. Hojas de 5 a 12 cm de anchura, con el margen áspero y finamente ciliado. Fruto duro, lustroso, amarillo, blanco o púrpura, dispuestos alrededor de un eje engrosado (Polunin, 1974). Fruto que crece lateralmente en una axila dilatada. Muy cultivada en todo el territorio (Polunin & Smythies, 1977).

Es originaria de América del Sur. Con crecimiento de Julio-Octubre. Es una importante planta alimenticia, base de importantes industrias de destilación o de almidón. El grano y las hojas son un buen alimento para el ganado, mientras que el maíz dulce, el maíz de palomitas y la harina de hornear tienen cierta importancia como alimento para el hombre (Polunin, 1974).

Existen diversos tipos de maíz, cuyo grano tiene distintos colores: amarillo, blanco y rojo. El maíz amarillo tiene un pigmento, la criptoxantina, que es un precursor de la vitamina A. En Estados Unidos, donde se cultivan grandes extensiones de maíz, se prefieren las variedades amarillas para la alimentación animal. Pero el pigmento amarillo

tiende a colorear la carne, lo que en el Reino Unido no se considera deseable, por lo que en este país se prefieren las variedades blancas de maíz para alimentar al ganado de engorde.

El maíz, como los demás cereales, tiene ciertas limitaciones cuando se emplea como alimento para animales de granja. Aunque es una excelente fuente de energía digestible, es pobre en proteína y la que posee es de baja calidad. Contiene unos 650 g/kg de almidón, tiene muy poca fibra y un valor elevado de energía metabolizable.

El contenido en proteína bruta del maíz es muy variable y generalmente oscila entre 80 y 130 g/kg, aunque últimamente se han conseguido variedades con cantidades más altas.

El grano de maíz está formado por dos tipos principales de proteínas. La zeína, presente en el endospermo, es la más importante cuantitativamente pero es deficiente en los aminoácidos esenciales triptófano y lisina. La otra proteína, la gluteína, que está en el endospermo y en el germen, es más rica en estos aminoácidos.

El aceite de maíz (30-60 g/kg), contiene gran proporción de ácidos grasos no saturados y produce en los animales una grasa blanda.

5.2.2.1. Subproductos del maíz:

En la fabricación de almidón y glucosa a partir del maíz se obtienen principalmente tres subproductos apropiados para la alimentación animal: harina de germen, salvado y harina de gluten. El germen es muy rico en aceite, la mayoría del cual puede ser extraído antes de convertirlo en harina (McDonald, 1986).

5.3. LEGUMINOSAE (LEGUMINOSAS, PAPILIONÁCEAS, FABÁCEAS)

Arboles, arbustos o plantas herbáceas angiospermas dicotiledóneas, con hojas casi siempre alternas, por lo general compuestas, con estípulas y frecuentemente con zarcillos. Flores generalmente con cinco sépalos y cinco pétalos que o bien tienen simetría respecto a un plano solamente y son "amariposadas" o "papilionáceas", con el pétalo superior formando un ancho *estandarte*, los dos pétalos laterales formando *alas* patentes y los dos inferiores, en parte soldados, formando una *quilla*, la cual encierra los estambres y el ovario, o bien son radialmente simétricas, o actinomorfas. Casi siempre tiene diez estambres, todos soldados por sus filamentos para constituir un tubo, o bien nueve soldados y uno libre, o también estambres numerosos y libres. Dispone de un sólo

carpelo, con placentación marginal. Fruto generalmente en legumbre, con varias semillas sin albumen, dehiscente longitudinalmente con dos valvas.

La clasificación tradicional de Polhill y Raven (1981), reconoce básicamente tres subfamilias:

- MIMOSOIDEAE, con numerosas flores agrupadas, actinomorfas, con muchos estambres conspicuos, por lo general más largos que los pétalos.

- CAESALPINOIDEAE, con flores papilionáceas pero cuyos estambres no se sueldan por sus filamentos.

- PAPILIONATAE, con flores amariposadas y filamentos estaminales soldados (Polinin, 1974).

Las leguminosas, debido a su elevado contenido proteico (principalmente en las semillas), constituye un aporte fundamental en la dieta, tanto de humanos como de animales domésticos.

Todas las especies son fijadoras de nitrógeno atmosférico gracias a unas bacterias (*Rhizobium* sp.pl.) que viven en los nódulos de las raíces, lo que hace que los suelos donde habitan sean más fértiles. Muchas de ellas han sido cultivadas como ornamentales, otras como plantas forrajeras y otras por sus semillas o legumbres o porque de ellas se extraen aceites, tinturas o principios activos medicinales (Castroviejo, 1999).

Taxonómica y botánicamente son de gran interés y se han utilizado por su habilidad para fijar nitrógeno por simbiosis con el *Rhizobium*, para proporcionar material de enseñanza (por ejemplo *vicia faba*) y para los mecanismos entomófilos de polinización. Ecológicamente juegan un papel importante en la vegetación mundial.

La familia de las leguminosa también forma parte de los pastos en proporción importante. Agronómicamente, es apreciada, además de por su asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno, por su resistencia a la sequía

Desde el punto de vista nutritivo, las leguminosas son superiores a las gramíneas en proteínas y minerales, esencialmente calcio, fósforo, magnesio, cobre y cobalto, y su valor nutritivo decae menos con la edad.

Un trastorno que se presenta a menudo en el ganado vacuno y ovino que

pasta en lugares donde predominan las leguminosas es el meteorismo, caracterizado por una acumulación de gas en el rumen. La causa principal del meteorismo es que los gases de la fermentación quedan retenidos entre una espuma estable que impide su eliminación mediante el eructo.

5.3.1. *Lens culinaris* MEDICUS (ERVUM LENS L.) (LENTEJAS)

Planta herbácea de hojas compuestas perteneciente a la familia Leguminosae. Pubescente, ramosa, anual de 20-40 cm, con 1-3 flores blancas, con venas lila, sobre largos pedúnculos axilares que terminan en punta fina. Flores de aproximadamente 1/2 cm; cáliz veloso, con dientes lineares, más largos que los pétalos. Hojas con 5-7 pares de folíolos estrechos, oblongos; zarcillo sencillo o ramificado; estípulas enteras. Fruto de 1-1^{1/2} cm, rectangular, lampiño. De origen desconocido; muy cultivada y en ocasiones naturalizada en Europa central y sudoriental. Las semillas son muy nutritivas y han constituido un importante alimento desde la época clásica. Buen forraje para el ganado (Polunin, 1974).

5.3.2. *Vicia faba* L. (FABA BONA MEDICUS) (Haba)

Erecta, glabra, bastante recia, de tallos cuadrangulares, anual, de 30-80 cm, con grandes flores blancas que tienen una mancha negra purpúrea, dispuestas en racimos axilares y casi sentados, de 2-6 flores. Flores de aproximadamente 2 cm. Hojas con 1-3 pares de folíolos grandes, ovales, gruesos, glaucos, sin zarcillos; estípulas grandes, dentadas, maculadas. Fruto muy grande, de 5-30 cm, pubescente, inflado, negro; semillas grandes, de 2-3 cm.

Probablemente originaria de Asia y naturalizada localmente en gran parte de Europa. Cultivada desde tiempos prehistóricos como alimento humano. También es un alimento importante para el ganado.

5.4. OBJETIVOS

5.5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.4. OBJETIVOS

•Estudiar las gramíneas y las leguminosas como posibles bioindicadores de daños toxicológicos producidos por el MeHg mediante el estudio del comportamiento de la germinación y del crecimiento en un tiempo determinado.

•Determinar su potencial bioindicador.

•Analizar los posibles bioindicadores individualmente para, en posterior análisis conjunto, categorizar, en caso positivo, su calidad bioindicadora.

•Comprobar la idoneidad de la metodología utilizada en este estudio.

•Cuantificar los factores de riesgo de no-germinación y [MeHg] en relación a los diferentes niveles tóxicos.

5.5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.5.1. Material

- Cámara de presión negativa
- Etiquetas
- Gradillas
- Jeringas
- Matraces
- Pipetas Pasteur
- Pinzas
- Placas de Petri
- Regla
- Semilleros de 9 cm de diámetro
- Semilleros de 5 cm de diámetro
- Sepiolita
- Tóxico: MeHg

La cámara de presión negativa es un elemento de seguridad que consiste en

una cámara acristalada y cerrada, en la que se mantiene una presión menor que la externa por extracción del aire a través de unos filtros apropiados que absorben los tóxicos. Esta circunstancia, impide la salida de gases del interior de la cámara hacia el exterior, protegiendo al operador de los mismos

5.5.2. Metodología

En un principio, se hicieron diversas pruebas sembrando las semillas en distintos substratos (tierra, arena, vermiculita y sepiolita), observando que el medio más adecuado para los experimentos a realizar era la sepiolita.

Germinación: Se considera germinada aquella semilla plantada que desarrolla un primordio germinal superior a 1 mm de altura durante un período de tiempo establecido (7 días). Esto no significa que el resto de las semillas sean estériles, sino que es posible que su retardo en la germinación sea superior.

No-germinación: Se considera no germinada aquella semilla plantada que no ha alcanzado un primordio germinal igual o inferior a 1 mm en el tiempo de estudio.

Para el estudio de la **cebada**, se sembraron 465 semillas distribuidas de la siguiente forma:

A) Un grupo control formado por 60 semillas y regado solamente con agua

B) Nueve grupos tóxicos formados por 45 semillas por grupo y regados con las distintas concentraciones de MeHg.

Para la siembra de cebada se han utilizado semilleros de 5 cm de diámetro. En cada uno de ellos se ponían 15 semillas que luego se cubrían con sepiolita y seguidamente se procedía a su riego. El grupo control, se regaba solamente con agua y los grupos experimentales se regaban con las distintas concentraciones tóxicas. La dosis de cada concentración tóxica era de 15 ml así como la de agua. Para cada concentración tóxica, se han utilizado tres recipientes (45 semillas por concentración). En los controles se han utilizado cuatro recipientes (60 semillas).

Todos los semilleros se introducían en una cámara de presión negativa, procediéndose a su observación diaria para vigilar el estado de hidratación de los cultivos a lo largo de siete días. El 3^{er} día se realizó el primer riego con 15 ml de agua y el 7^o día se procedió a contar el número de plantas germinadas y a medir la longitud del tallo.

Las concentraciones del tóxico utilizadas fueron de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90 y 1.95 ppm (Fig. 5.2a).

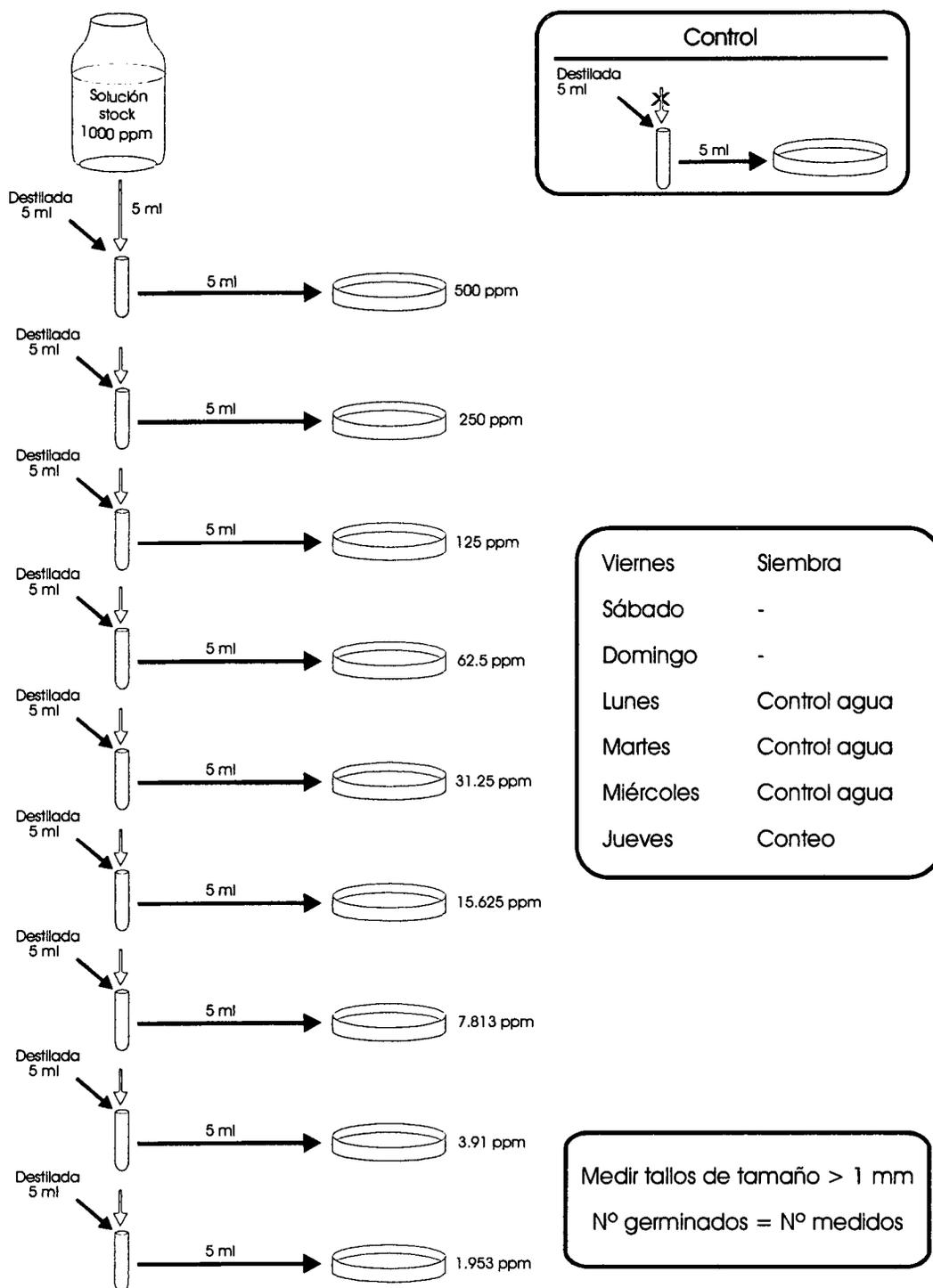


Fig. 5.2a: Diluciones de metilmercurio

Para el estudio del **maíz**, se sembraron 438 semillas distribuidas de la siguiente forma:

A) Un grupo control formado por 60 semillas y regado solamente con agua.

B) Nueve grupos tóxicos formados por 42 semillas por grupo y regados con las distintas concentraciones del tóxico.

Para la siembra, se han utilizado recipientes de 5 cm de diámetro. En cada uno de ellos se ponían 6 semillas que luego se cubrían con sepiolita. Para cada concentración se han utilizado siete recipientes (42 semillas por concentración). Luego se regaban con las distintas concentraciones de MeHg y se introducían en la cámara de presión negativa donde se dejaban durante siete días. La dosis de tóxico era de 10 ml. En los controles se utilizaron diez recipientes (60 semillas) y se regaban con 10 ml de agua. El 3^{er} día se regaban todos los grupos con 10 ml de agua y el 7^o día se procedía a contar el número de germinados y a medir la longitud del tallo.

Las concentraciones del tóxico utilizadas fueron las mismas que en la cebada, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90 y 1.95 ppm.

Para el estudio de las **lentejas**, se sembraron 1000 semillas distribuidas de la siguiente forma:

A) Un grupo control, formado por 100 semillas y regado solamente con agua.

B) Nueve grupos tóxicos, formados por 100 semillas cada grupo y regados con las distintas concentraciones tóxicas.

Para la siembra se utilizaron Placas de Petri. En cada una de ellas se ponían 25 semillas. Se utilizaron cuatro placas por cada concentración de tóxico (100 semillas para cada concentración), más otras cuatro placas para los controles (100 semillas). Después se cubrían con sepiolita y se regaba cada placa experimental con 5 ml de cada concentración del tóxico. Las concentraciones utilizadas de MeHg fueron de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90 y 1.95 ppm. Tras la intoxicación, las placas se pasaban a la cámara de presión negativa. Se observaban diariamente para ver las necesidades de agua y el 3^{er} día se regaban todas las placas con 5 ml de agua; el 7^o día se procedía a contar el número de germinados y a medir la longitud del tallo.

Para el estudio de las **habas**, se sembraron 220 semillas distribuidas de la

siguiente forma:

A) Un grupo control, formado por 40 semillas y regado solamente con agua.

B) Nueve grupos tóxicos, formados por 20 semillas por grupo y regados con las distintas concentraciones del tóxico.

En la siembra se utilizaron recipientes de 9 cm de diámetro. En cada uno de ellos se ponían 10 semillas que se cubrían con sepiolita, se regaban con agua, en el caso del grupo control y con las diferentes concentraciones tóxicas en los otros grupos para a continuación introducirlos en la cámara de presión negativa. Para cada concentración del tóxico se utilizaron dos recipientes (20 semillas por concentración) y para los controles cuatro (40 semillas). Las concentraciones utilizadas de MeHg fueron las mismas que en los casos anteriores.

En las habas, se ha observado que necesitan más días para germinar, por lo que las necesidades de riego fueron mayores. el proceso de contar el número de germinados y medir la longitud del tallo fue a partir del 7º día del comienzo de la germinación.

5.6. RESULTADOS

Tabla 5.I: Germinación y altura (mm) de *H. vulgare*

Nº	Control	1,95	3,9	7,81	15,62	31,25	62,5	125	250	500
1	147	140	155	117	150	144	61	47	20	0
2	147	134	134	117	133	143	55	17	0	0
3	141	127	127	116	131	121	50	0	0	0
4	138	121	123	115	128	117	43	0	0	0
5	133	116	120	111	123	112	29	0	0	0
6	122	115	117	110	111	110	27	0	0	0
7	121	112	117	108	107	102	19	0	0	0
8	116	112	106	107	107	101	18	0	0	0
9	114	110	104	103	105	100	17	0	0	0
10	112	107	102	102	104	97	15	0	0	0
11	104	107	102	101	104	95	12	0	0	0
12	99	98	101	100	102	92	12	0	0	0
13	94	95	100	92	96	92	11	0	0	0
14	93	95	96	87	92	90	11	0	0	0
15	91	94	96	85	90	89	9	0	0	0
16	91	90	93	85	84	86	7	0	0	0
17	90	89	93	83	82	85	6	0	0	0
18	88	87	88	81	82	80	5	0	0	0
19	83	85	85	80	81	75	4	0	0	0
20	82	76	80	79	78	67	0	0	0	0
21	77	75	80	71	76	60	0	0	0	0
22	76	61	74	65	72	49	0	0	0	0
23	65	58	67	49	72	57	0	0	0	0
24	65	50	59	46	71	51	0	0	0	0
25	62	45	53	35	66	45	0	0	0	0
26	60	43	53	30	66	46	0	0	0	0
27	49	42	52	11	66	44	0	0	0	0
28	49	35	33	10	65	36	0	0	0	0
29	45	31	30	9	62	39	0	0	0	0
30	37	30	27	7	60	33	0	0	0	0
31	32	16	20	6	57	22	0	0	0	0
32	32	14	17	6	56	21	0	0	0	0
33	29	13	16	6	47	0	0	0	0	0
34	28	12	14	5	46	0	0	0	0	0
35	26	11	12	5	41	0	0	0	0	0
36	26	0	11	4	10	0	0	0	0	0
37	25	0	11	0	0	0	0	0	0	0
38	25	0	10	0	0	0	0	0	0	0
39	20	0	9	0	0	0	0	0	0	0
40	20	0	6	0	0	0	0	0	0	0
41	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	15									
47	14									
48	13									
49	12									
50	11									
51	9									
52	8									
53	8									
54	7									
55	5									
56	5									
57	0									
58	0									
59	0									
60	0									
Total	60	45								

5.6.1. Bioindicador: *Hordeum vulgare*

Muestra: Los resultados generales obtenidos de la siembra de 465 semillas de cebada plantadas y distribuidas en un grupo control (n = 60 semillas; ppm MeHg = 0) y nueve grupos de concentraciones progresivas de MeHg (rango 1,95 – 500 ppm; n = 45 semillas/concentración) cultivadas durante siete días, se muestran en la tabla 5.I.

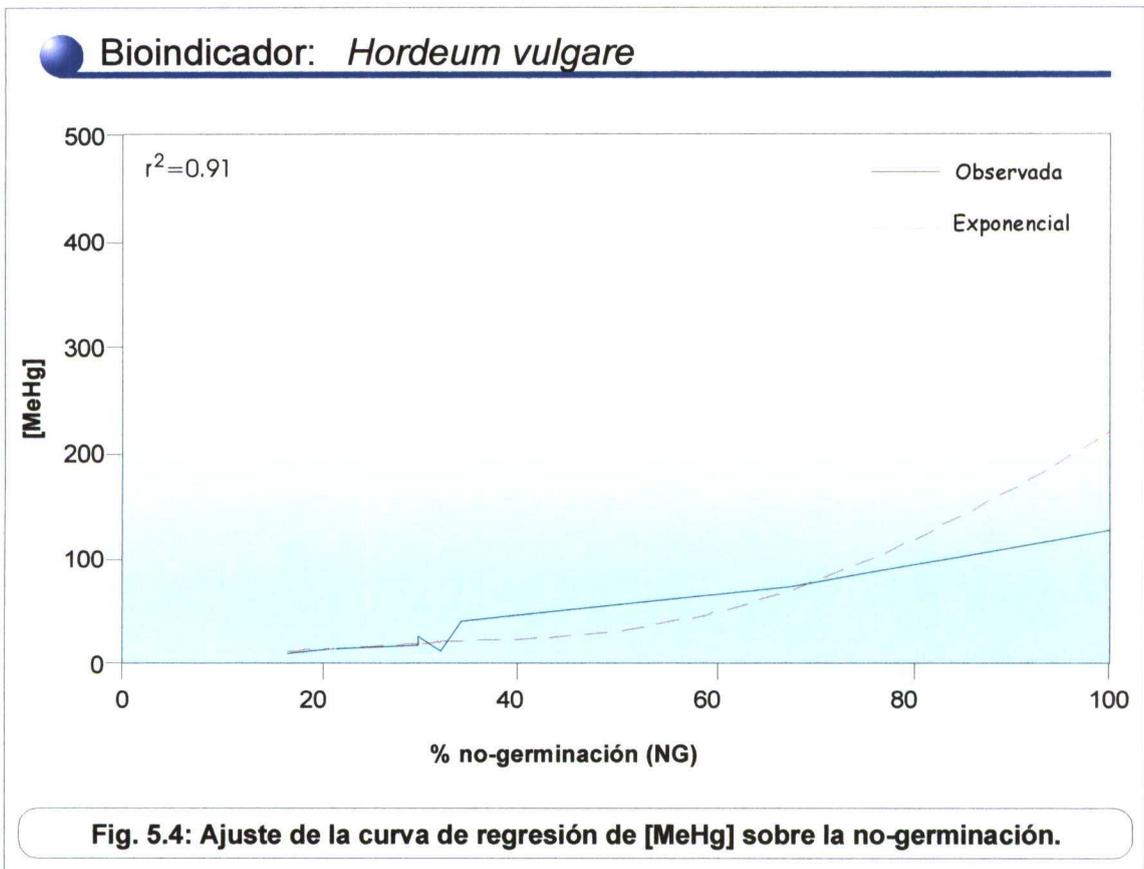
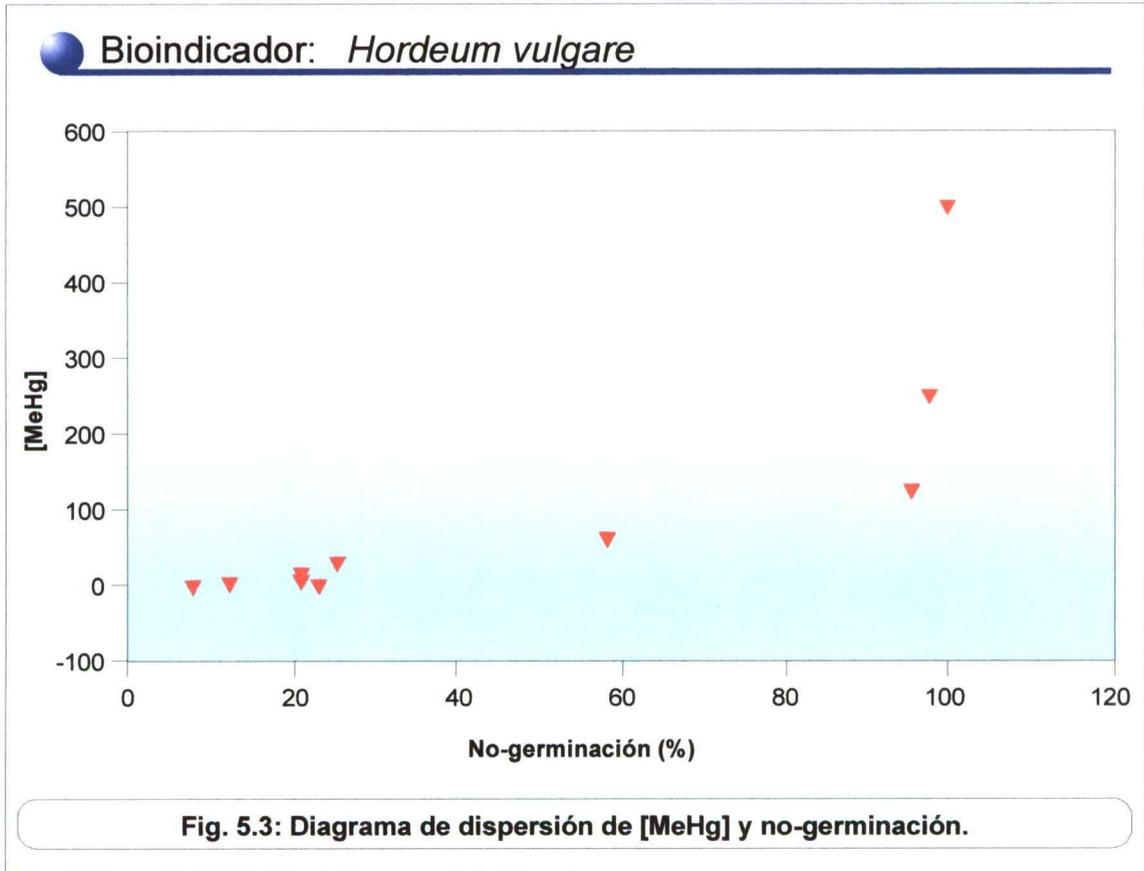
5.6.1.1. Germinación

De las semillas de cebada plantadas, no germinó el 44.3% (Tabla 5.II). El mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el control (93.3%), y la menor en la concentración 500 ppm que se comportó como letal. Estos porcentajes variaron significativamente en las diferentes concentraciones ($\chi^2 = 252.1$; gl = 9; p < 0.001) (Tabla 5.II)

			Germinación	
			Si	No
PPM	control	N	56	4
		(%)	93,3%	6,7%
1.9		N	35	10
		(%)	77,8%	22,2%
3.9		N	40	5
		(%)	88,9%	11,1%
7.8		N	36	9
		(%)	80,0%	20,0%
15.6		N	36	9
		(%)	80,0%	20,0%
31.25		N	34	11
		(%)	75,6%	24,4%
62.5		N	19	26
		(%)	42,2%	57,8%
125		N	2	43
		(%)	4,4%	95,6%
250		N	1	44
		(%)	2,2%	97,8%
500		N	,00	45
		(%)		100,0%
Total		N	259	206
		(%)	55,7%	44,3%

Tabla 5.II: Porcentaje de germinación y [MeHg] en *H. Vulgare*

Las variables porcentaje de no-germinación (NG) y concentraciones de [MeHg] se ajustaron a una distribución normal (z = 0.97; p = 0.29 y z = 0.92; p = 0.36 respectivamente).



El estudio de regresión de [MeHg] sobre el porcentaje de inhibición germinativa (IG) , demostró una correlación significativa y directa con un mejor ajuste de la curva proporcionado por la ecuación exponencial ($r^2 = 0.911$; $gl = 8$; $p < 0.001$) (Fig 5.4). De forma que:

$$[\text{MeHg}] = \ln (6.894) e^{0.034 (\text{IG } H. \text{ vulgare})}$$

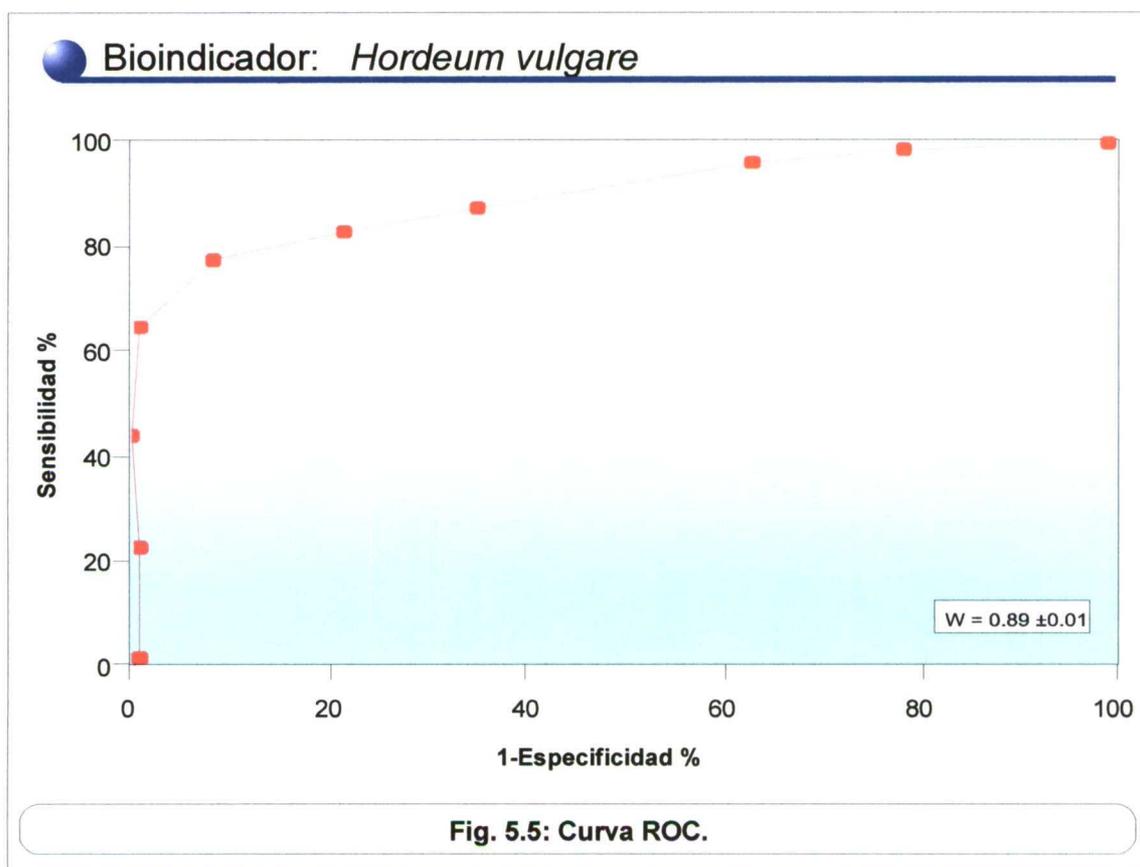
Análisis de riesgos de no-germinación

La tabla 5.III muestra el estudio de riesgos de no-germinación y su modelo regresivo. Contrastadas las distintas concentraciones con el control, todas se comportaron como factores de bio-riesgo ($OR > 1$) y, salvo la concentración 3.90 ppm, todos fueron significativos. A partir de la concentración 31.25 ppm, se incrementaron exponencialmente.

VARIABLE	β	DS	OR	IC 95%
Concentración				
Control	-	-	1	-
1.95	1.386	0.63	4	1.16 – 13.74
3.90	0.559	0.70	1.75	0.44 – 6.93
7.81	1.252	0.63	3.5	1.003 – 12.21
15.6	1.252	0.63	3.5	1.003 – 12.21
31.25	1.510	0.62	4.53	1.33 – 15.36
62.5	2.952	0.59	19.2	5.92 – 61.9
125	5.707	0.88	301	52.6 – 1720.5
250	6.423	1.13	616	66.5 – 5709.2
500	-	-	Indet	-
β_0	-2.639	0.52		-

Tabla 5.III: Modelo regresivo de no-germinación de *Hordeum vulgare*
 (-2LL=335.8; bondad de ajuste; 419.9; χ^2 del modelo=223.3; $gl=8$; $p < 0.001$; Indet = indeterminado)

Para una tasa de incidencia de no-germinación de 0.44, el modelo obtenido acreditó para un punto de corte óptimo de 0.24 : sensibilidad = 0.767; especificidad = 0.915: valor predictivo positivo = 0.878; valor predictivo negativo = 0.832 ; clasificación correcta = 0.849. La Fig.5.5 muestra la curva ROC obtenida de las predicciones individuales que acreditó un buen área predictiva ($W = 0.89 \pm 0.01$).

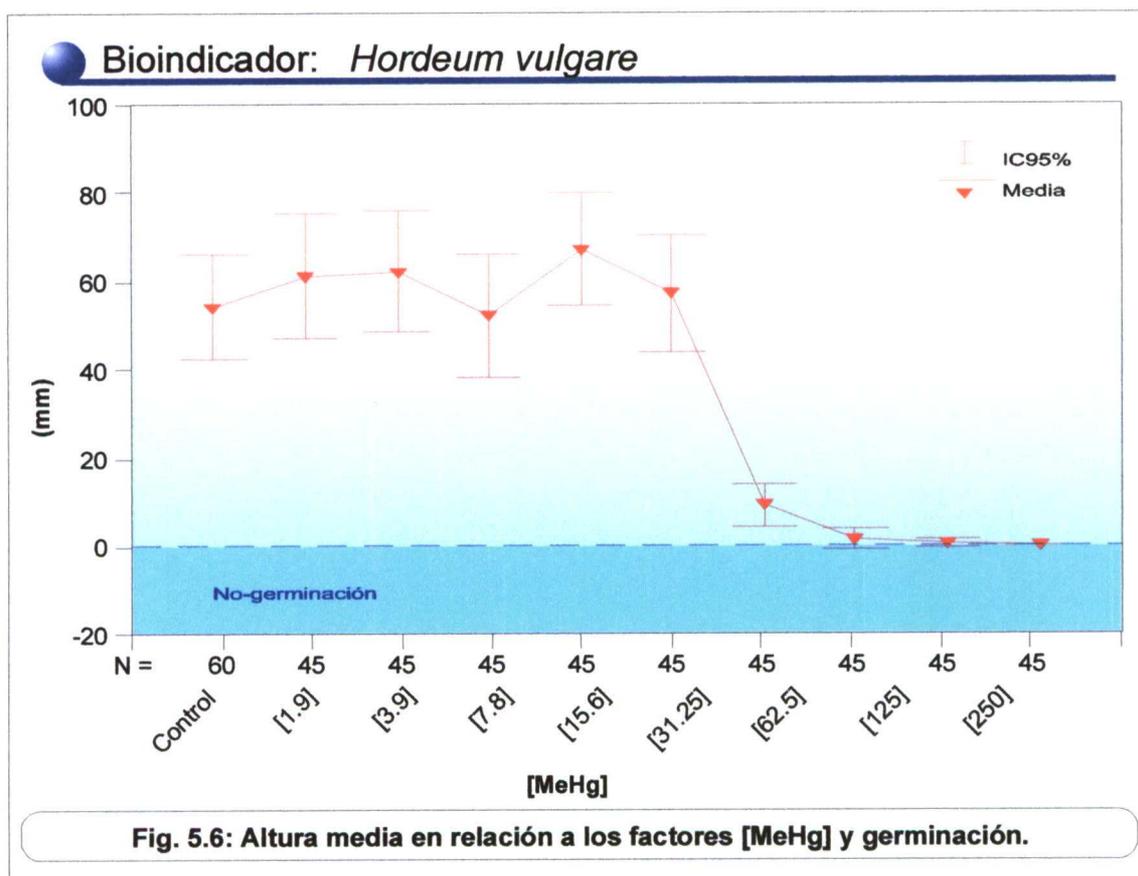


5.6.1.2.Crecimiento

La tabla 5.IV muestra la distribución de las alturas medias alcanzadas en relación a los factores concentración y germinación.

PPM	Germinación	Media	± DS	N
control	Si	58,00	44,65	56
	No	,00	,00	4
	Total	54,13	45,51	60
1.9	Si	78,46	38,25	35
	No	,00	,00	10
	Total	61,02	47,10	45
3.9	Si	69,83	43,20	40
	No	,00	,00	5
	Total	62,07	46,33	45
7.8	Si	65,11	42,49	36
	No	,00	,00	9
	Total	52,09	46,15	45
15.6	Si	83,97	29,59	36
	No	,00	,00	9
	Total	67,18	43,01	45
31.25	Si	75,44	34,24	34
	No	,00	,00	11
	Total	57,00	44,21	45
62.5	Si	21,63	17,81	19
	No	,00	,00	26
	Total	9,13	15,70	45
125	Si	32,00	21,21	2
	No	,00	,00	43
	Total	1,42	7,40	45
250	Si	20,00	,	1
	No	,00	,00	44
	Total	,44	2,98	45
500	No	,00	,00	45
	Total	,00	,00	45
Total	Si	66,46	41,15	259
	No	,00	,00	206
	Total	37,02	45,10	465

Tabla V.IV: Distribución de la altura media en relación a la germinación y [MeHg] en *H. vulgare*



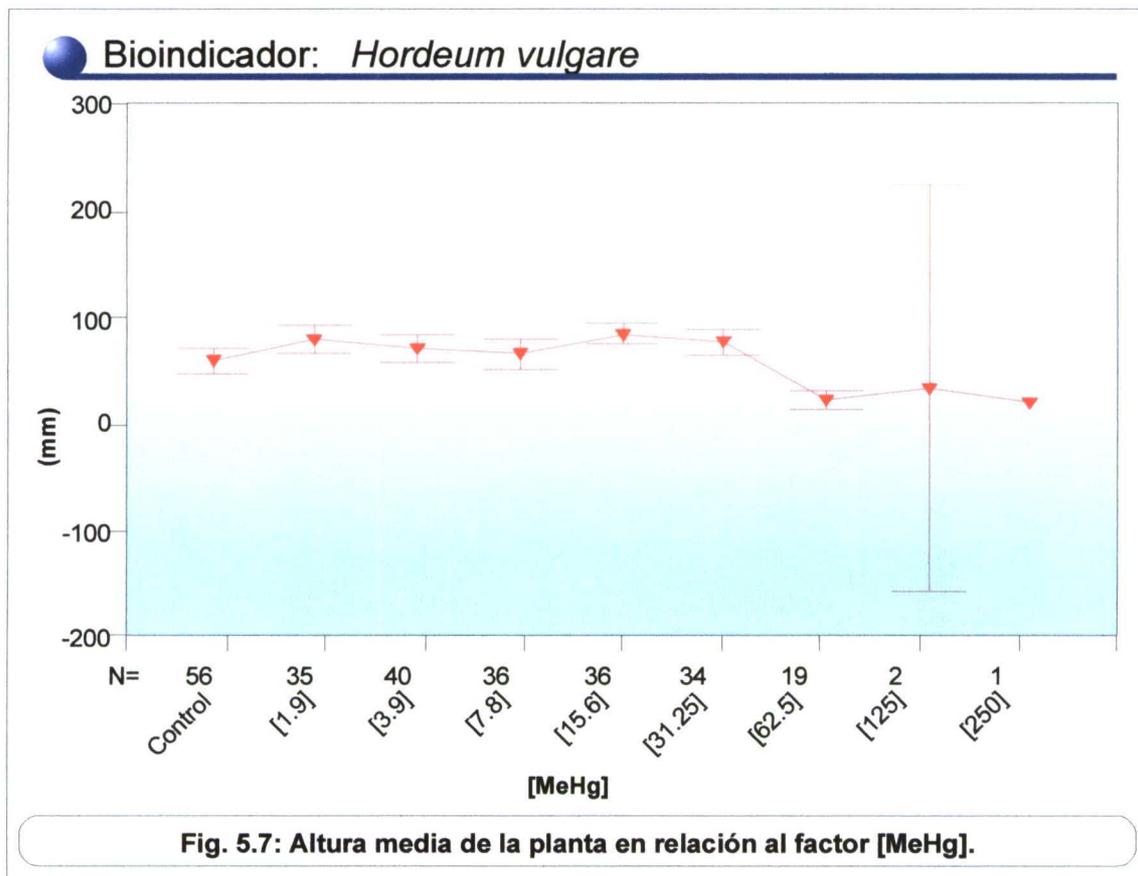
Las diferencias totales de altura (Fig. 5.6) en relación a la interacción de los factores germinación y concentraciones de MeHg fueron altamente significativas ($F = 4.30$; $p < 0.001$).

Las varianzas fueron heterogéneas (Levene: $F = 40.3$; $p < 0.001$). Analizadas las diferencias entre grupos, se apreció que la significación con el control comenzó en la concentración 62.5 ppm ($p < 0.001$), manteniéndose en todas las concentraciones posteriores. La tabla 5.V muestra las significaciones intergrupos obtenidas.

Concentración A	Concentración B	(A-B) media	±ES	p
Control	1.95	-6.89	5.687	1.00
	3.90	-7.93	5.687	1.00
	7.81	2.04	5.687	1.00
	15.6	-13.04	5.687	0.999
	31.25	-2.87	5.687	1.00
	62.5	45.00	5.687	0.001
	125	52.71	5.687	0.001
	250	53.69	5.687	0.001
	500	54.13	5.687	0.001
1.95	3.90	-1.04	6.079	1.00
3.90	7.81	9.98	6.079	1.00
7.81	15.6	-15.09	6.079	0.995
15.6	31.25	10.18	6.079	1.00
31.25	62.5	47.87	6.079	0.001
62.5	125	7.71	6.079	0.169
125	250	0.98	6.079	1.00
250	500	0.44	6.079	1.00

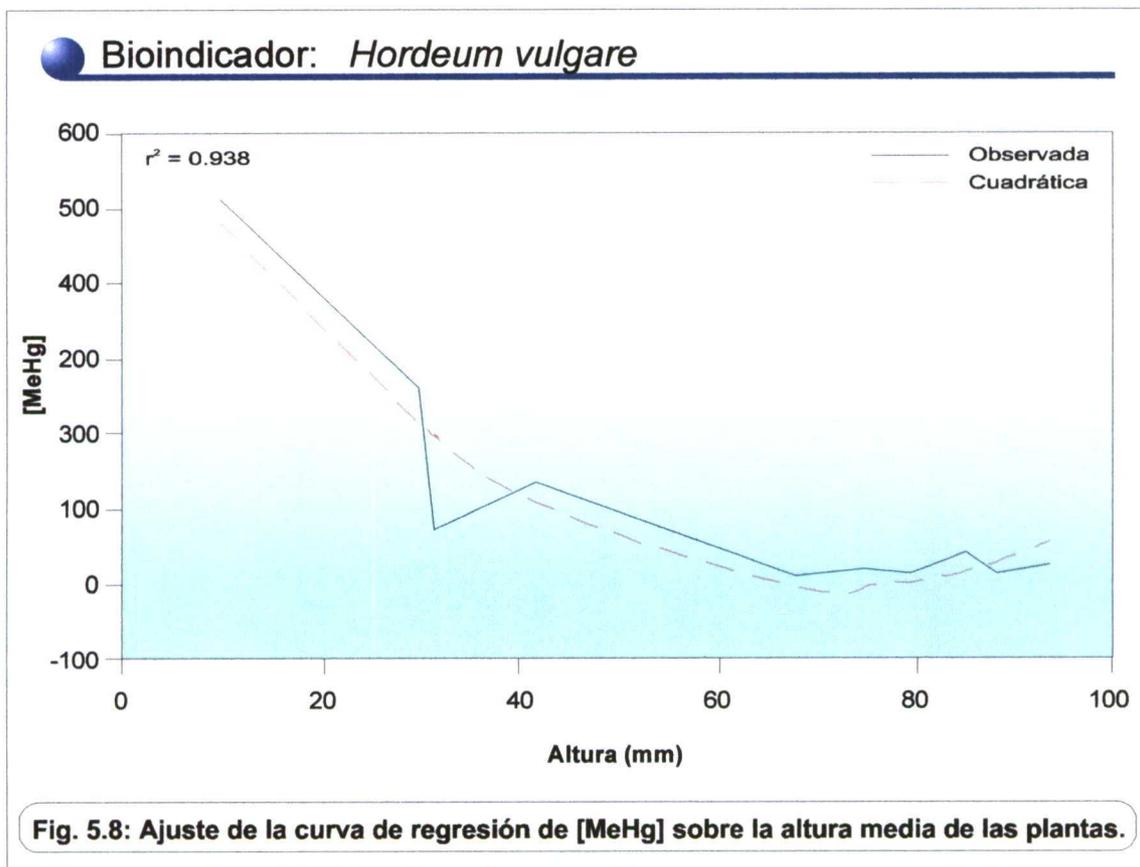
Tabla V.V: Comparaciones múltiples de la altura de *H. vulgare*
(Estadístico de Tahmane)

La Fig. 5.7 muestra las diferencias de alturas medias de las plantas sin considerar el factor germinación.



La altura media (**A**) de la cebada germinada se ajustó a la normalidad ($z = 0.63$; $p = 0.81$) y en la regresión de [MeHg] sobre ella guardó una correlación inversa y significativa con un mejor ajuste en curva cuadrática ($r^2 = 0.90$, $gl = 7$; $p = 0.001$)(Fig. 5.8). De forma que:

$$[\text{MeHg}] = 649.2 - 18.2(\mathbf{A}_{H. \text{ vulgare}}) + 0.12(\mathbf{A}_{H. \text{ vulgare}})^2$$



5.6.2. Bioindicador: *Zea mays*

Muestra: La tabla 5.VI. muestra los resultados generales de las 438 semillas de maíz plantadas y distribuidas en un grupo control ($n = 60$; ppm [MeHg] = 0) y nueve concentraciones progresivas de MeHg (rango 1.95 – 500 ppm; $n_{\text{concentración}} = 42$) cultivadas a lo largo de siete días.

Tabla 5.VI: Germinación y altura del tallo (mm) de *Zea mays*

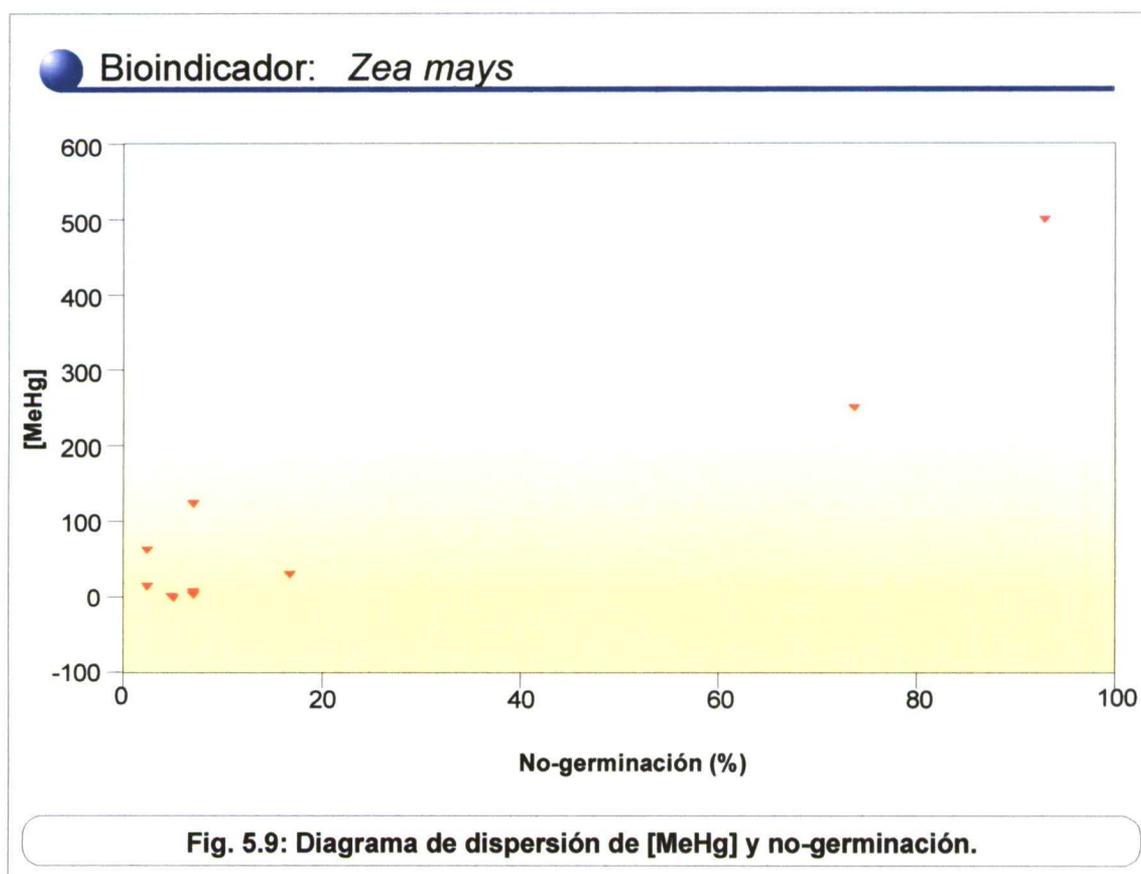
Nº	Control	1.95	3.90	7.81	15.62	31.25	62.5	125	250	500
1	149	123	152	140	123	145	116	119	44	10
2	144	120	136	120	115	114	114	102	43	9
3	141	118	130	103	115	111	110	80	39	7
4	135	118	128	101	113	108	104	77	38	0
5	135	115	127	100	11	96	96	76	34	0
6	133	114	120	99	109	93	86	70	33	0
7	130	112	116	96	100	91	86	69	31	0
8	127	110	115	96	97	80	85	69	9	0
9	125	104	113	95	95	77	84	67	7	0
10	124	101	112	95	94	75	81	64	5	0
11	123	101	112	95	92	73	73	59	5	0
12	118	100	106	93	91	69	69	49	0	0
13	118	100	106	91	91	65	65	40	0	0
14	115	96	106	91	82	63	62	28	0	0
15	114	95	94	91	80	56	61	17	0	0
16	114	94	90	91	77	56	59	17	0	0
17	113	93	88	89	76	53	39	16	0	0
18	113	93	88	88	75	46	37	15	0	0
19	113	93	87	88	72	46	35	13	0	0
20	111	91	86	87	68	40	31	12	0	0
21	111	91	86	86	68	34	29	12	0	0
22	110	90	85	85	67	32	26	12	0	0
23	109	90	82	84	65	30	25	11	0	0
24	109	88	81	83	63	26	24	11	0	0
25	107	83	78	82	62	23	17	11	0	0
26	107	82	78	81	61	16	15	11	0	0
27	105	78	77	81	60	15	9	11	0	0
28	104	77	76	79	60	15	9	11	0	0
29	103	72	76	77	58	11	9	10	0	0
30	100	67	75	76	52	10	9	10	0	0
31	99	60	72	76	48	9	7	8	0	0
32	99	59	71	75	46	9	7	5	0	0
33	97	59	63	73	41	8	6	5	0	0
34	96	57	60	72	16	7	6	5	0	0
35	94	55	59	67	15	5	6	5	0	0
36	94	44	43	63	15	0	5	5	0	0
37	93	41	41	55	11	0	5	5	0	0
38	93	40	36	47	11	0	5	0	0	0
39	92	12	32	33	7	0	4	0	0	0
40	91	6	0	0	6	0	4	0	0	0
41	90	0	0	0	4	0	4	0	0	0
42	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	82									
44	81									
45	80									
46	77									
47	76									
48	68									
49	66									
50	65									
51	60									
52	57									
53	55									
54	34									
55	33									
56	25									
57	18									
58	0									
59	0									
60	0									
N =	60	42	42	42	42	42	42	42	42	42

5.6.2.1. Germinación

De las 438 semillas de maíz plantadas, no germinó el 21.0 %. El mayor porcentaje de germinación se obtuvo en las concentraciones 15.62 y 62.5 ppm (97.6%) y el menor en la concentración 500 ppm (7.1%). Los porcentajes en las diferentes concentraciones variaron significativamente ($\chi^2 = 251.6$; gl = 9; $p < 0.001$) (Tabla 5.VII)

Concentración	Germinación					N
	Si		No		N	
	N	%	N	%		
Control	57	95,0%	3	5,0%	60	
[1.9]	40	95,2%	2	4,8%	42	
[3.9]	40	95,2%	2	4,8%	42	
[7.8]	39	92,9%	3	7,1%	42	
[15.6]	41	97,6%	1	2,4%	42	
[31.25]	35	83,3%	7	16,7%	42	
[62.5]	41	97,6%	1	2,4%	42	
[125]	39	92,9%	3	7,1%	42	
[250]	11	26,2%	31	73,8%	42	
[500]	3	7,1%	39	92,9%	42	
Total	346	79,0%	92	21,0%	438	

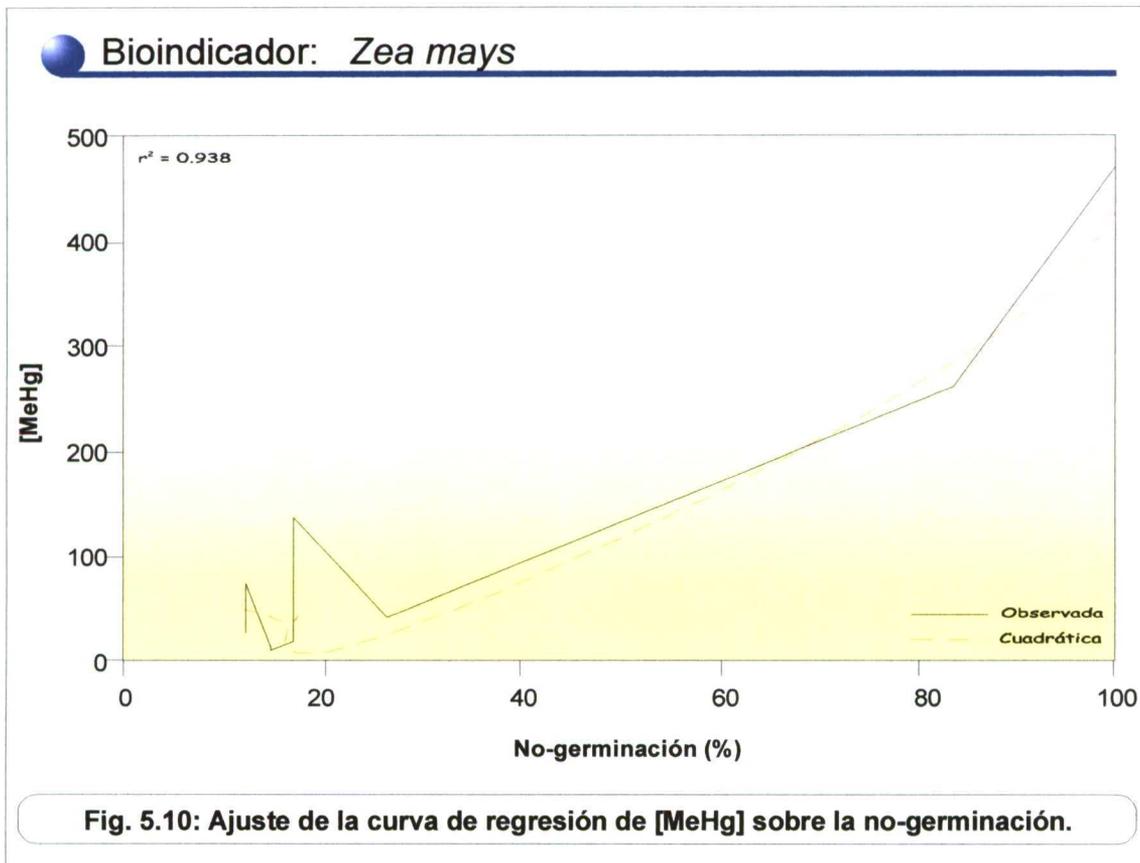
Tabla 5.VII: Porcentajes de germinación de *Zea mays*



La variable porcentaje de no-germinación (NG) del maíz se ajustó a la distribución normal ($z = 1.18$; $p = 0.12$). La fig. 5.9 muestra el diagrama de dispersión de [MeHg] en relación al porcentaje de germinación inhibida.

El estudio de regresión de [MeHg] sobre el porcentaje de la inhibición germinativa (IG), demostró una correlación directa y significativa apreciándose que el mejor ajuste era proporcionado por la curva cúbica ($r^2 = 0.938$; $gl = 6$; $p < 0.001$) (Fig. 5.10). De forma que:

$$[\text{MeHg}] = 10.84 + 2.92 (\text{IG}_{Z. \text{mays}}) - 0.079 (\text{IG}_{Z. \text{mays}})^2 + 0.001 (\text{IG}_{Z. \text{mays}})^3$$



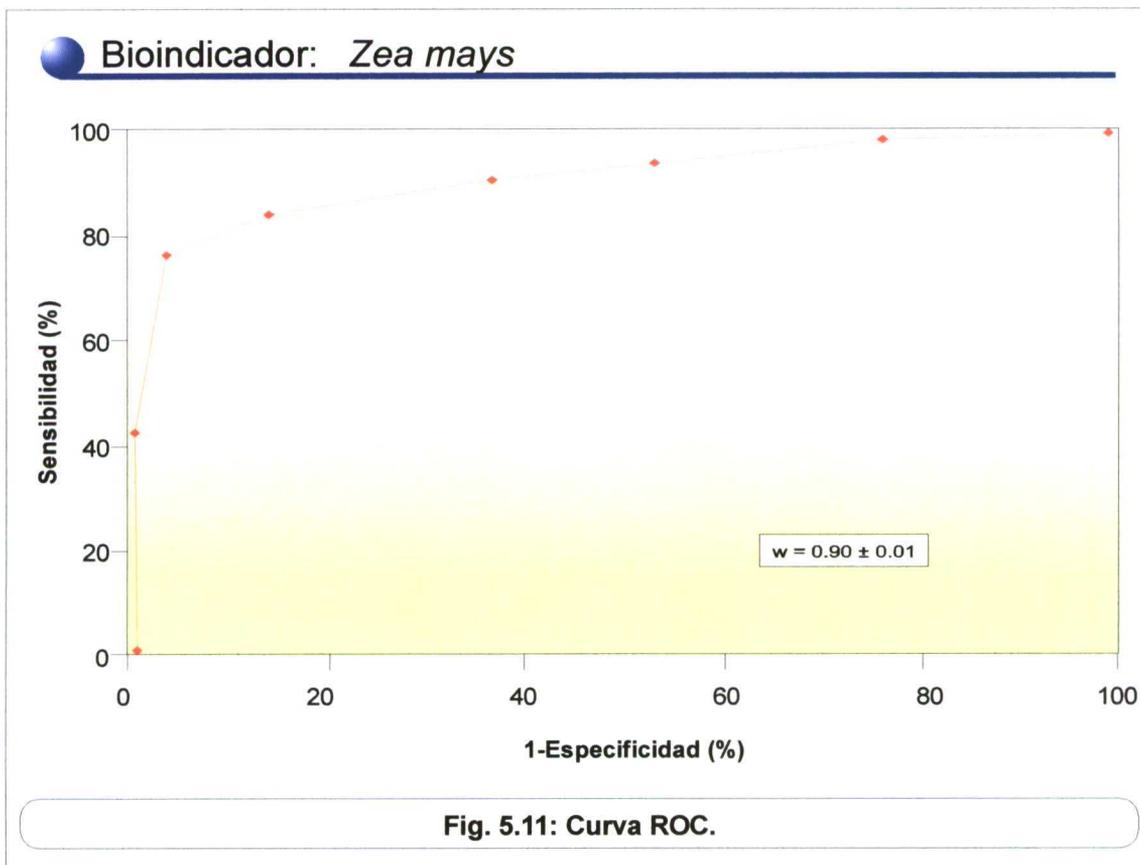
Análisis de riesgos de no-germinación

La tabla 5.VIII muestra el modelo regresivo y el resultado del análisis de riesgos. A partir de la concentración 250 ppm de [MeHg] (OR = 53.5; IC = 13.8 – 206.4), los riesgos aumentan significativamente, alcanzando el riesgo máximo en la concentración 500 ppm (OR = 246.9; IC = 47.3 –1287.8)

VARIABLE	β	DS	OR	IC 95%
Concentración				
Control	-	-	1	-
1.95	- 0.05	0.93	0.95	0.15 – 5.94
3.90	- 0.05	0.93	0.95	0.15 – 5.94
7.81	0.379	0.84	1.46	0.28 – 7.62
15.6	- 0.76	1.17	0.46	0.04 – 4.61
31.25	1.33	0.72	3.8	0.92 – 15.6
62.5	- 0.76	1.17	0.46	0.04 – 4.61
125	0.37	0.84	1.46	0.28 – 7.62
250	3.98	0.68	53.5	13.8 – 206.4
500	5.50	0.84	246.9	47.3 – 1287.8
β_0	- 2.94	0.59	-	-

TABLA 5.VIII: Modelo regresivo de riesgos de no-germinación en *Zea mays* (-2LL = 225.8 ; bondad de ajuste: 437.9; χ^2 del modelo = 224.3; gl = 9; p < 0.001)

La Fig. 5.11 muestra la curva ROC obtenida que acreditó una buena área predictiva (W = 0.90; DS = 0.01). El punto de corte óptimo sobre una tasa de no-germinación de 0.21 fue de 0.16 (sensibilidad = 0.76; especificidad 0.96; índice predictivo positivo = 83.3; índice predictivo negativo = 0.94; clasificación correcta = 0.92).



5.6.2.2.Crecimiento

La tabla 5.IX muestra la distribución de la altura media en relación a los factores concentración y germinación. La fig. 5.12 expone los resultados.

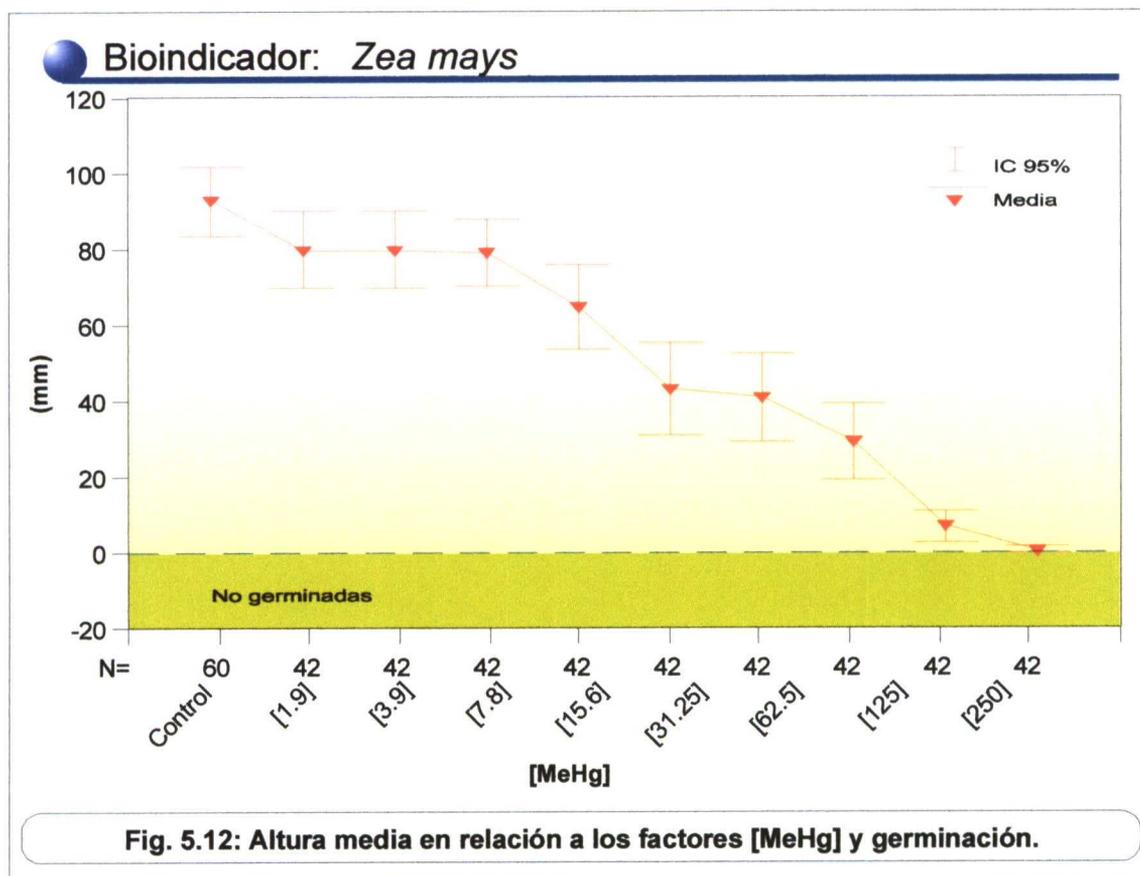
Concentración	Germinación	Media	± DS	N
Control	Si	97,54	29,25	57
	No	,00	,00	3
	Total	92,67	35,66	60
[1.9]	Si	83,70	28,22	40
	No	,00	,00	2
	Total	79,71	32,91	42
[3.9]	Si	83,70	28,22	40
	No	,00	,00	2
	Total	79,71	32,91	42
[7.8]	Si	85,23	18,22	39
	No	,00	,00	3
	Total	79,14	28,31	42
[15.6]	Si	66,15	34,28	41
	No	,00	,	1
	Total	64,57	35,37	42
[31.25]	Si	51,63	37,39	35
	No	,00	,00	7
	Total	43,02	39,22	42
[62.5]	Si	42,05	37,43	41
	No	,00	,	1
	Total	41,05	37,54	42
[125]	Si	31,56	31,71	39
	No	,00	,00	3
	Total	29,31	31,61	42
[250]	Si	26,18	16,11	11
	No	,00	,00	31
	Total	6,86	14,11	42
[500]	Si	8,67	1,53	3
	No	,00	,00	39
	Total	,62	2,28	42
Total	Si	67,54	38,59	346
	No	,00	,00	92
	Total	53,35	43,98	438



BIBLIOTECA

Tabla 5.IX: Altura media en relación a la germinación y [MeHg] de *Zea mays*

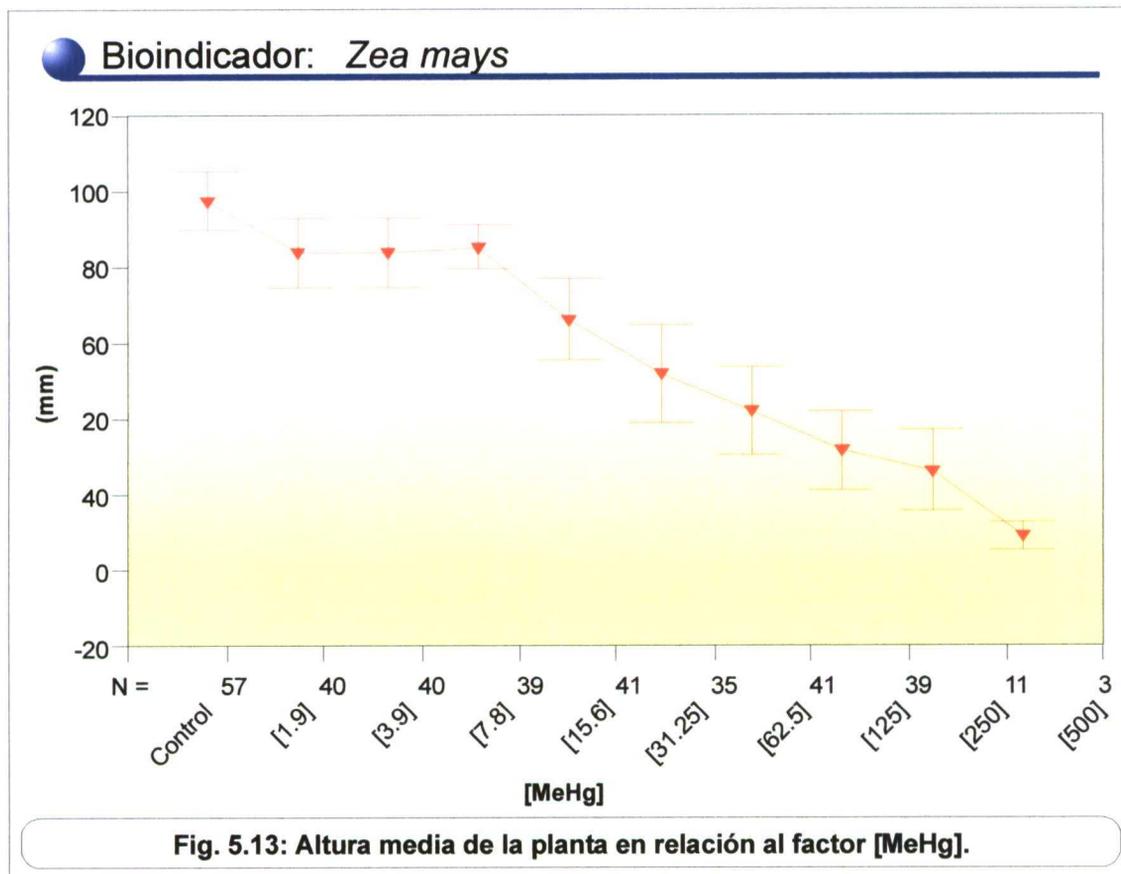
Las diferencias totales de altura (Fig. 5.12) fueron significativas en relación a los factores [MeHg] y germinación ($F = 3.67$; $gl = 9$; $p < 0.001$). Las varianzas fueron heterogéneas (Levene: $F = 12.3$; $p < 0.001$). Las diferencias inter-grupos mostraron que en relación al control la significación en la reducción de la altura del tallo comenzó con la concentración 15.6 ppm (Tabla 5.X).



Concentración A	Concentración B	Diferencia media (A-B)	±DS	p
Control	1.95	12.95	5.5	0.944
	3.90	12.95	5.5	0.944
	7.81	13.52	5.5	0.804
	15.6	28.10	5.5	0.007
	31.25	49.64	5.5	0.001
	62.5	51.62	5.5	0.001
	125	63.36	5.5	0.001
	250	85.81	5.5	0.001
	500	92.05	5.514	0.001
1.95	3.90	0.00	5.981	1.00
3.90	7.81	0.57	5.981	1.00
7.81	15.6	14.57	5.981	0.843
15.6	31.25	21.55	5.981	0.359
31.25	62.5	1.98	5.981	1.00
62.5	125	11.74	5.981	0.998
125	250	22.45	5.981	0.004
250	500	6.24	5.981	0.273

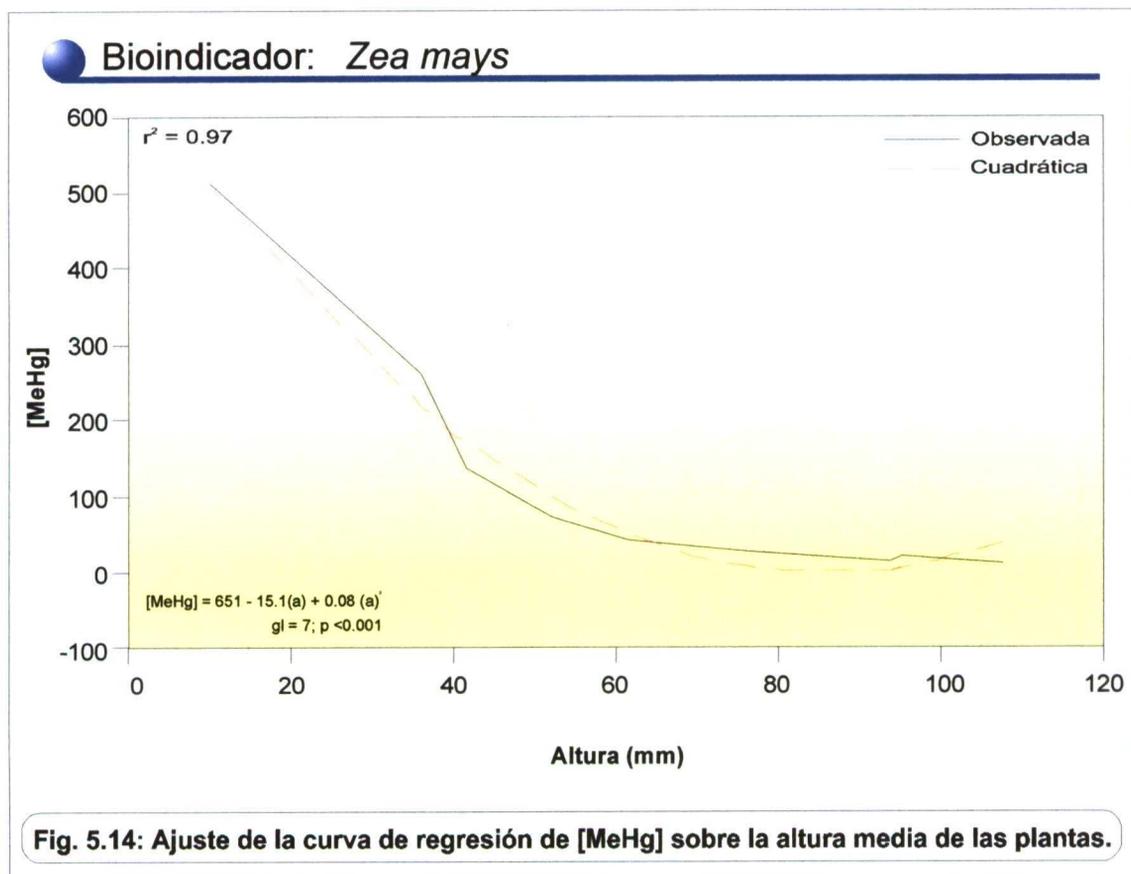
Tabla 5.X: Comparaciones múltiples de la altura de Zea mays (Estadístico de Tahmane)

La Fig. 5.13 muestra las diferencias de las alturas medias de las plantas sin considerar el factor germinación.



La variable altura media (**A**) del maíz se ajustó a la distribución normal ($z = 0.63$; $p = 0.81$) y guardó en la regresión de [MeHg] sobre ella, una correlación inversa y significativa con un mejor ajuste a la curva cuadrática ($r^2 = 0.97$; $gl = 7$; $p < 0.001$) (Fig. 5.14). De forma que:

$$[\text{MeHg}] = 651 - 15.1 (\mathbf{A}_{Z. mays}) + 0.08 (\mathbf{A}_{Z. mays})^2$$



5.6.3. Bioindicador: *Lens culinaris*

Muestra: Los resultados generales de altura y germinación obtenidos en las 1000 semillas de lentejas, distribuidas en un grupo control ($n = 100$ semillas; (ppm MeHg = 0) y nueve concentraciones progresivas de MeHg (rango 1.95 - 500 ppm; $n_{\text{concentración}} = 100$ semillas), tras siete días de cultivo, se muestran en la tabla 5.XI.

Tabla 5.XI: Germinación y altura (mm) *L. culinaris*

Nº	Control	1.95	3.90	7.81	15.62	31.25	62.5	125	250	500
1	140	67	61	64	54	44	32	31	23	12
2	136	66	59	60	52	42	32	25	22	11
3	127	65	55	58	45	41	32	23	21	11
4	124	65	55	56	41	41	32	21	17	10
5	124	62	52	54	41	36	31	20	15	9
6	120	62	52	52	40	31	30	20	11	8
7	120	62	51	50	40	31	30	19	11	7
8	119	60	50	50	40	30	29	19	9	6
9	118	60	50	50	40	30	28	18	8	6
10	118	60	50	50	40	30	27	18	8	5
11	114	60	50	46	40	28	26	17	6	5
12	113	59	50	46	37	28	25	17	6	5
13	112	58	48	46	36	27	22	16	6	5
14	112	56	46	45	36	26	22	16	6	0
15	111	55	46	43	35	25	22	15	6	0
16	110	55	46	42	35	24	21	15	6	0
17	108	55	46	42	35	23	21	15	5	0
18	108	55	45	42	35	23	21	15	5	0
19	107	55	44	42	34	22	20	15	5	0
20	107	54	44	41	34	22	20	15	0	0
21	105	54	43	41	33	22	19	14	0	0
22	105	54	43	41	33	21	19	13	0	0
23	105	53	43	40	32	21	18	12	0	0
24	104	53	42	40	32	21	17	12	0	0
25	101	52	42	40	32	21	17	12	0	0
26	100	51	42	40	32	20	17	12	0	0
27	96	51	42	40	32	20	16	12	0	0
28	95	51	42	40	32	20	16	12	0	0
29	95	50	42	40	32	20	16	11	0	0
30	95	50	42	40	31	19	16	11	0	0
31	92	50	42	39	30	19	15	11	0	0
32	91	50	40	39	30	19	15	11	0	0
33	87	50	40	38	28	19	15	11	0	0
34	83	50	40	38	26	19	15	11	0	0
35	83	49	40	38	26	18	15	10	0	0
36	82	49	39	37	26	17	14	10	0	0
37	80	49	39	37	26	17	14	10	0	0
38	80	49	38	37	25	17	14	10	0	0
39	80	49	38	36	24	16	14	10	0	0
40	78	48	37	36	24	16	13	10	0	0
41	78	48	36	36	22	15	12	10	0	0
42	76	48	36	35	22	15	12	10	0	0
43	75	48	36	35	22	15	12	10	0	0
44	75	46	36	35	22	15	12	9	0	0
45	75	46	35	35	21	15	11	9	0	0
46	75	46	33	35	21	14	11	9	0	0
47	74	46	33	35	20	14	11	8	0	0
48	73	45	32	34	20	14	11	8	0	0

49	73	45	32	34	20	14	10	8	0	0
50	72	45	32	34	20	13	10	8	0	0
51	72	45	32	33	20	13	10	8	0	0
52	72	45	32	33	18	13	10	8	0	0
53	71	45	32	32	18	12	9	8	0	0
54	71	44	32	31	18	12	9	8	0	0
55	71	44	31	31	17	12	9	7	0	0
56	70	43	31	31	17	12	9	6	0	0
57	70	42	30	31	16	12	9	6	0	0
58	70	42	30	30	16	12	8	5	0	0
59	70	41	30	30	16	10	8	5	0	0
60	69	41	30	30	15	10	8	5	0	0
61	68	41	29	30	15	10	8	5	0	0
62	66	41	28	30	15	10	8	4	0	0
63	66	41	28	29	15	10	8	4	0	0
64	66	41	27	28	14	10	7	4	0	0
65	65	40	27	28	14	9	6	0	0	0
66	65	40	27	28	14	9	6	0	0	0
67	63	40	26	27	13	8	6	0	0	0
68	62	40	26	25	13	8	6	0	0	0
69	62	39	26	25	13	8	6	0	0	0
70	62	38	26	25	13	8	6	0	0	0
71	62	37	25	25	13	8	6	0	0	0
72	61	37	25	23	12	8	5	0	0	0
73	60	37	24	23	12	8	5	0	0	0
74	59	36	22	22	12	8	5	0	0	0
75	59	35	22	22	12	8	5	0	0	0
76	56	35	22	22	12	7	5	0	0	0
77	56	35	21	22	12	7	5	0	0	0
78	56	35	21	21	12	7	4	0	0	0
79	55	34	21	21	11	7	0	0	0	0
80	55	33	20	21	11	7	0	0	0	0
81	55	32	20	21	11	6	0	0	0	0
82	54	32	20	21	10	6	0	0	0	0
83	54	32	20	20	10	6	0	0	0	0
84	54	30	19	20	10	5	0	0	0	0
85	53	30	19	18	10	5	0	0	0	0
86	52	30	18	17	10	5	0	0	0	0
87	51	29	18	16	9	5	0	0	0	0
88	50	27	18	16	9	5	0	0	0	0
89	49	26	16	15	8	5	0	0	0	0
90	49	26	15	13	8	0	0	0	0	0
91	48	26	11	12	8	0	0	0	0	0
92	40	24	10	12	8	0	0	0	0	0
93	40	24	9	11	5	0	0	0	0	0
94	35	20	9	10	0	0	0	0	0	0
95	31	18	0	8	0	0	0	0	0	0
96	10	12	0	0	0	0	0	0	0	0
97	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	100									

5.6.3.1. Germinación

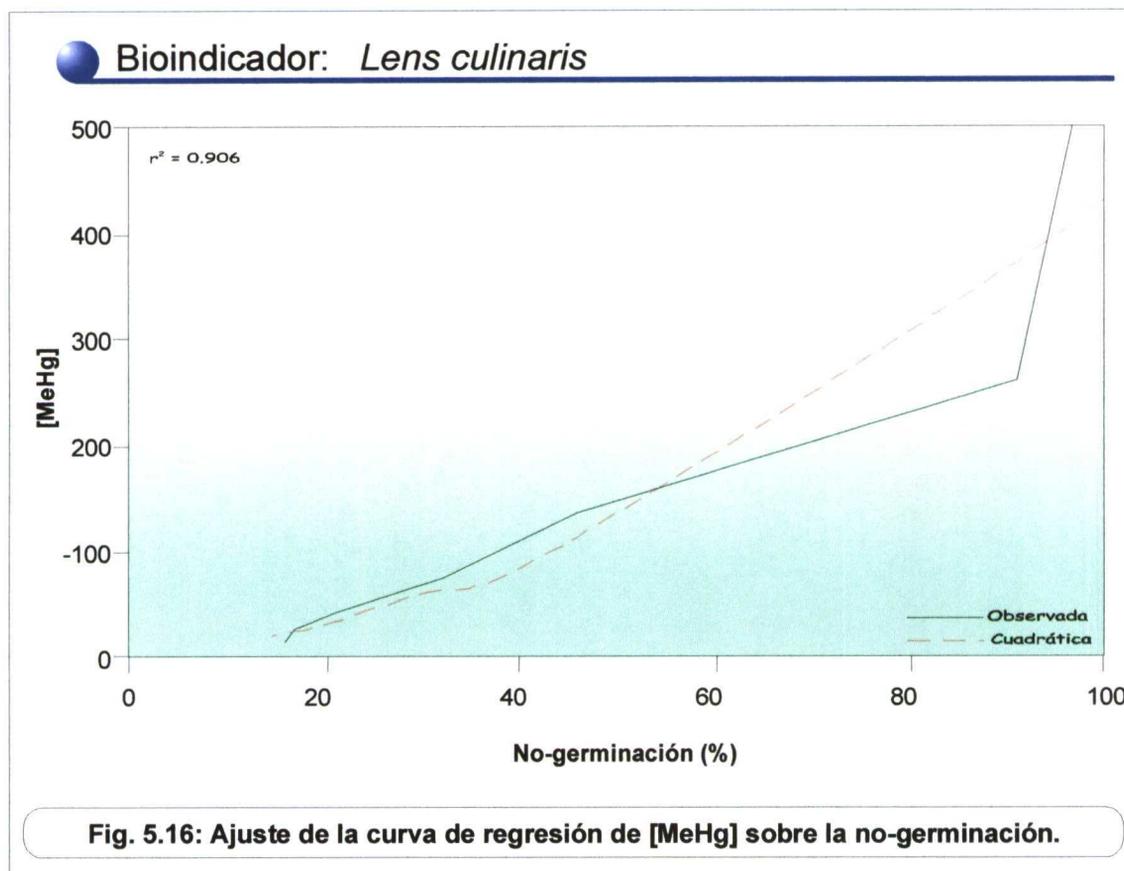
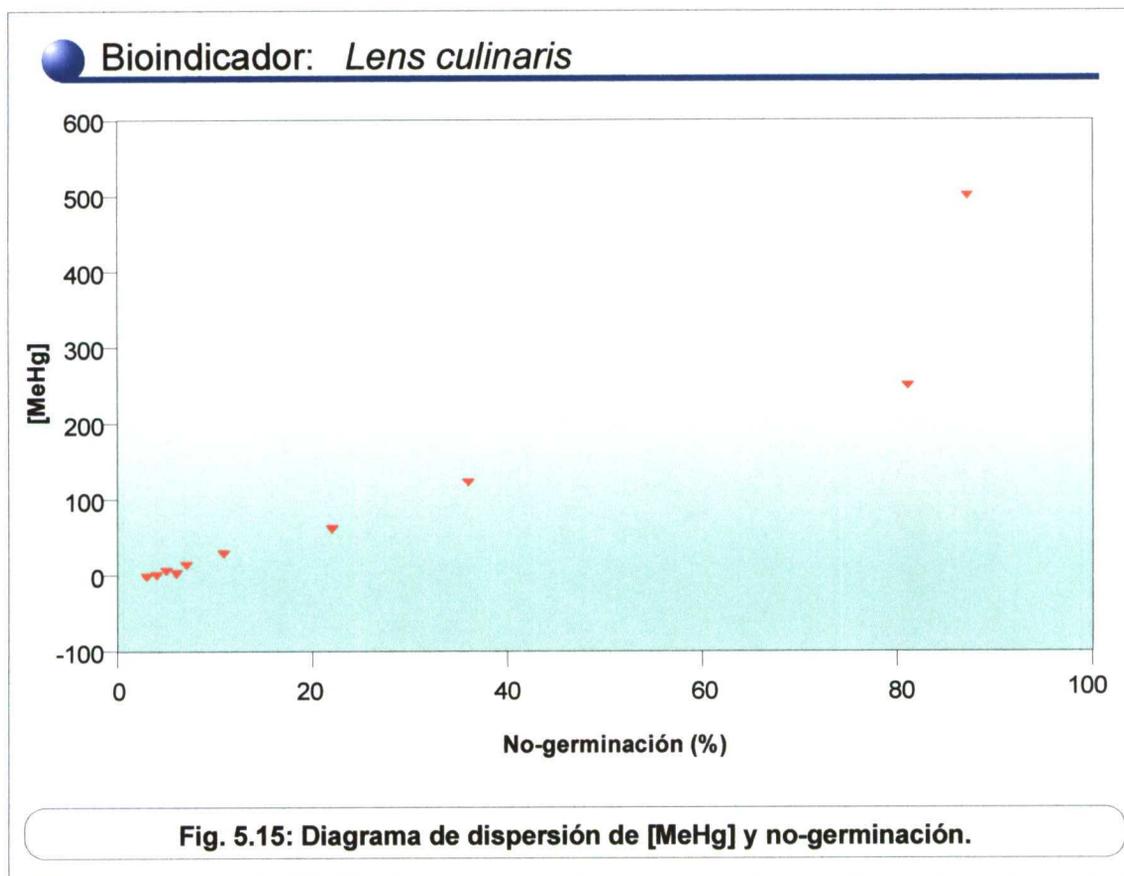
De las 1000 semillas plantadas, no germinó el 26.2%. El mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el control (97%), y el menor en la concentración 500 ppm (13%). Los porcentajes en las diferentes concentraciones variaron significativamente ($\chi^2 = 410.0$; gl = 9; $p < 0.001$) (Tabla 5.XII).

	Germinación			
	Si		No	
	N	(%)	N	(%)
Concentración Control	97	97,0%	3	3,0%
[1.9]	96	96,0%	4	4,0%
[3.9]	94	94,0%	6	6,0%
[7.8]	95	95,0%	5	5,0%
[15.6]	93	93,0%	7	7,0%
[31.25]	89	89,0%	11	11,0%
[62.5]	78	78,0%	22	22,0%
[125]	64	64,0%	36	36,0%
[250]	19	19,0%	81	81,0%
[500]	13	13,0%	87	87,0%
Total	738	73,8%	262	26,2%

Tabla 5.XII: Porcentajes de germinación y [MeHg] de *L. culinaris*

Los porcentajes de germinación de la lenteja se ajustaron a la distribución normal ($z = 0.95$; $p = 0.31$). La regresión entre porcentaje de inhibición de la germinación (IG) y [MeHg], cuyo diagrama de dispersión muestra la Fig. 5.15, demostró una correlación directa y significativa y mejor ajuste mediante curva cuadrática ($r^2 = 0.906$; gl = 7; $p < 0.001$) (Fig. 5-16). De forma que :

$$[\text{MeHg}] = 0.0071 + 0.791(\text{IG}_{L. culinaris}) + 0.036(\text{IG}_{L. culinaris})^2$$



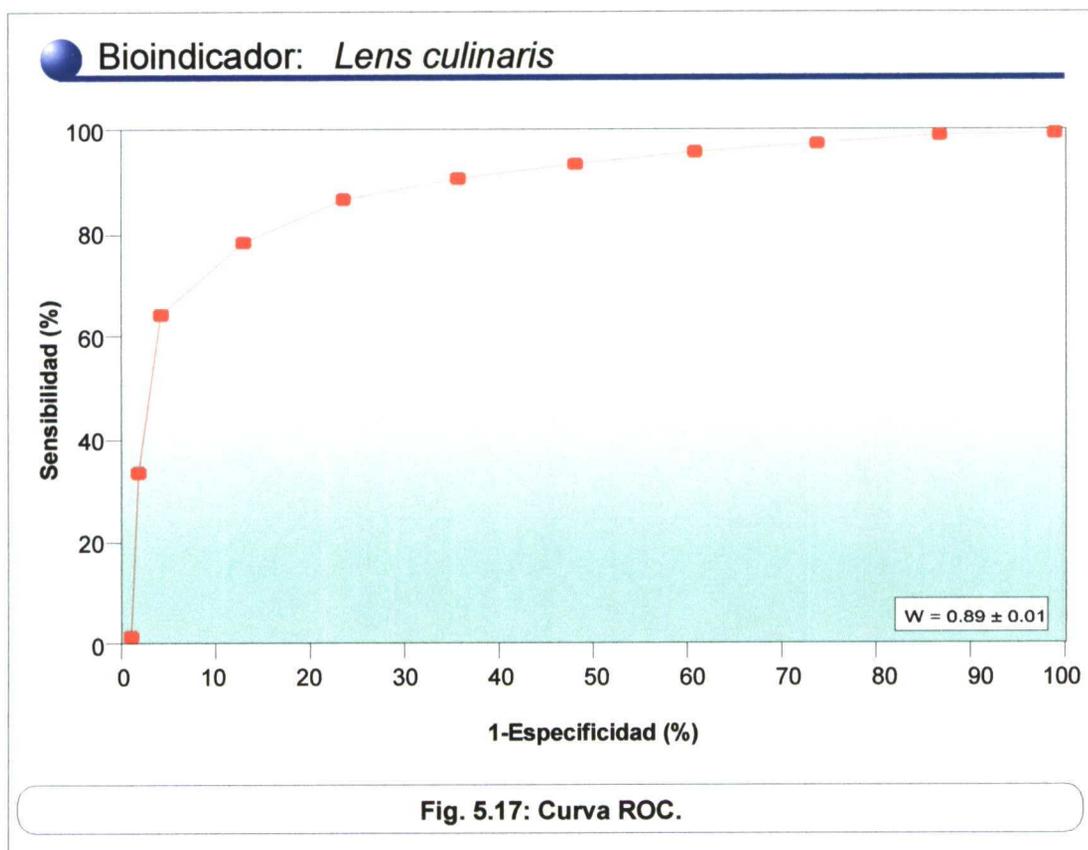
Análisis de riesgos de no-germinación

El modelo regresivo obtenido se muestra en la tabla 5.XIII. Si bien todas las concentraciones en relación al grupo control se comportaron como factores de riesgo, la significación estadística apareció a partir de la concentración 31.25 ppm (OR = 3.99; IC95% = 1.07 – 17.78) incrementándose exponencialmente en las concentraciones posteriores y alcanzando el máximo riesgo en la concentración 500 ppm (OR = 216.3; IC95% = 59.6 - 784.6).

VARIABLE	β	ES	OR	IC 95%
Concentración				
Control	-	-	1	-
1.95	0.298	0.77	1.34	0.29 – 6.17
3.90	0.724	0.72	2.06	0.50 – 8.49
7.81	0.531	0.74	1.70	0.39 – 7.31
15.6	0.889	0.70	2.43	0.61 – 9.69
31.25	1.385	0.66	3.99	1.07 – 17.78
62.5	2.210	0.63	9.11	2.63 – 31.58
125	2.900	0.62	18.18	5.37 – 61.55
250	4.926	0.63	137.8	39.3 – 482.4
500	5.377	0.65	216.3	59.6 – 784.6
β_0	- 3.476	0.58	-	-

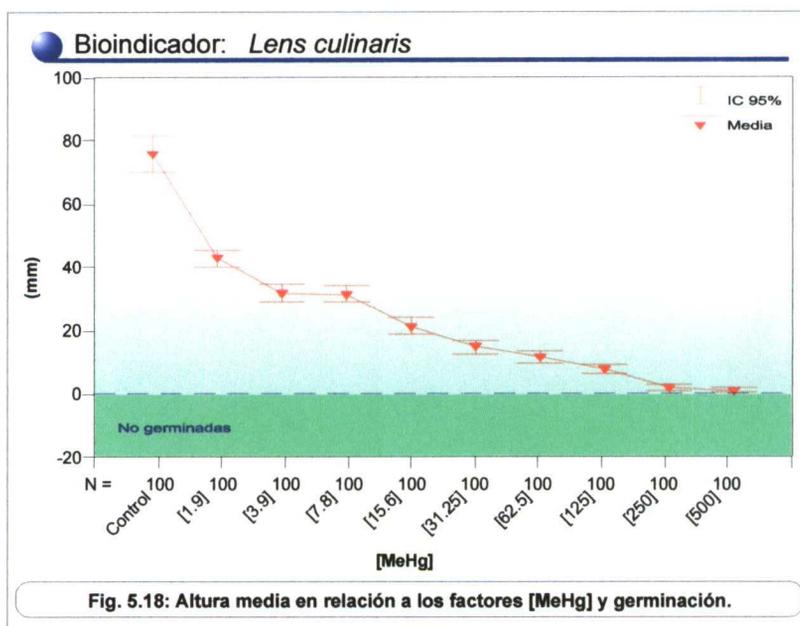
Tabla 5.XIII: Modelo regresivo de no-germinación de la *L. culinaris*
 (- 2LL= 676.2; bondad de ajuste; 999.9; χ^2 del modelo= 474.0; gl = 9; p <0.001)

La Fig. 5.17 muestra la curva ROC obtenida sobre las predicciones del modelo y su área predictiva (W = 0.89; ES = 0.01). Sobre una tasa de no germinación de 0.26, la matriz de clasificación para el punto de corte óptimo de 0.36 acreditó: sensibilidad = 64.1%; especificidad = 95.7; valor predictivo positivo = 88.2, con una eficacia del 74%.



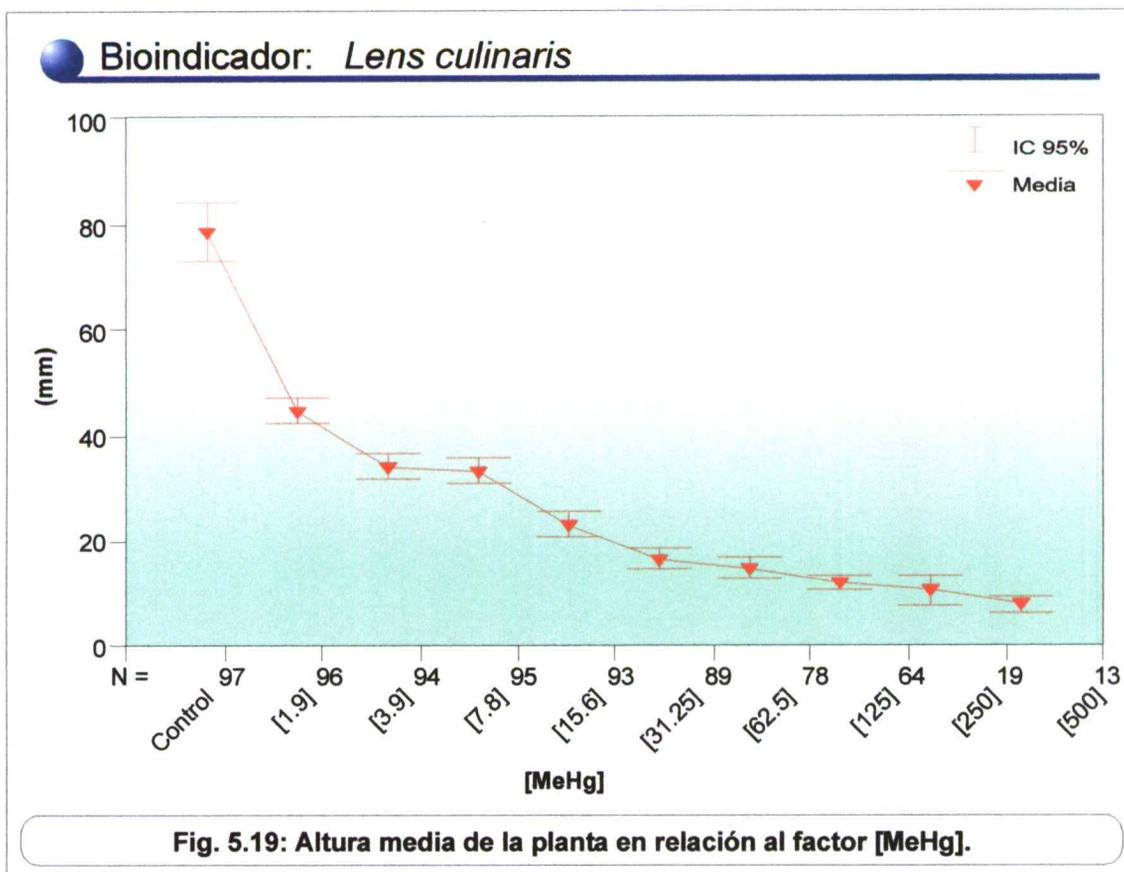
5.6.3.2. Crecimiento

Las varianzas de las alturas medias fueron heterogéneas (Levene ; $F = 47.6$; $p < 0.001$). La tabla 5.XIV muestra los valores de la variable en relación a los factores [MeHg] y germinación y la Fig. 5.18 muestra el efecto significativo de la interacción de ambos factores ($F = 15.3$; $p < 0.001$).



Diluciones	Germinación	Media	± DS	N
Control	si	78,29	26,82	97
	no	,00	,00	3
	Total	75,94	29,62	100
[1.9]	si	44,49	11,55	96
	no	,00	,00	4
	Total	42,71	14,31	100
[3.9]	si	33,85	12,01	94
	no	,00	,00	6
	Total	31,82	14,17	100
[7.8]	si	33,08	11,85	95
	no	,00	,00	5
	Total	31,43	13,63	100
[15.6]	si	22,91	11,47	93
	no	,00	,00	7
	Total	21,31	12,52	100
[31.2]	si	16,42	9,34	89
	no	,00	,00	11
	Total	14,61	10,21	100
[62.5]	si	14,69	8,04	78
	no	,00	,00	22
	Total	11,46	9,37	100
[125]	si	11,98	5,42	64
	no	,00	,00	36
	Total	7,67	7,22	100
[250]	si	10,32	6,18	19
	no	,00	,00	81
	Total	1,96	4,85	100
[500]	si	7,69	2,63	13
	no	,00	,00	87
	Total	1,00	2,76	100
Total	si	32,51	24,81	738
	no	,00	,00	262
	Total	23,99	25,66	1000

Tabla 5.XIV: Distribución de la altura media en relación a [MeHg] y germinación de *L. culinaris*.



Analizadas las diferencias entre grupos, se apreció significación de todas las concentraciones con el control ($p < 0.001$), correspondiendo la mayor diferencia a la concentración 500 ppm. La tabla 5.XV muestra las significaciones entre grupos.

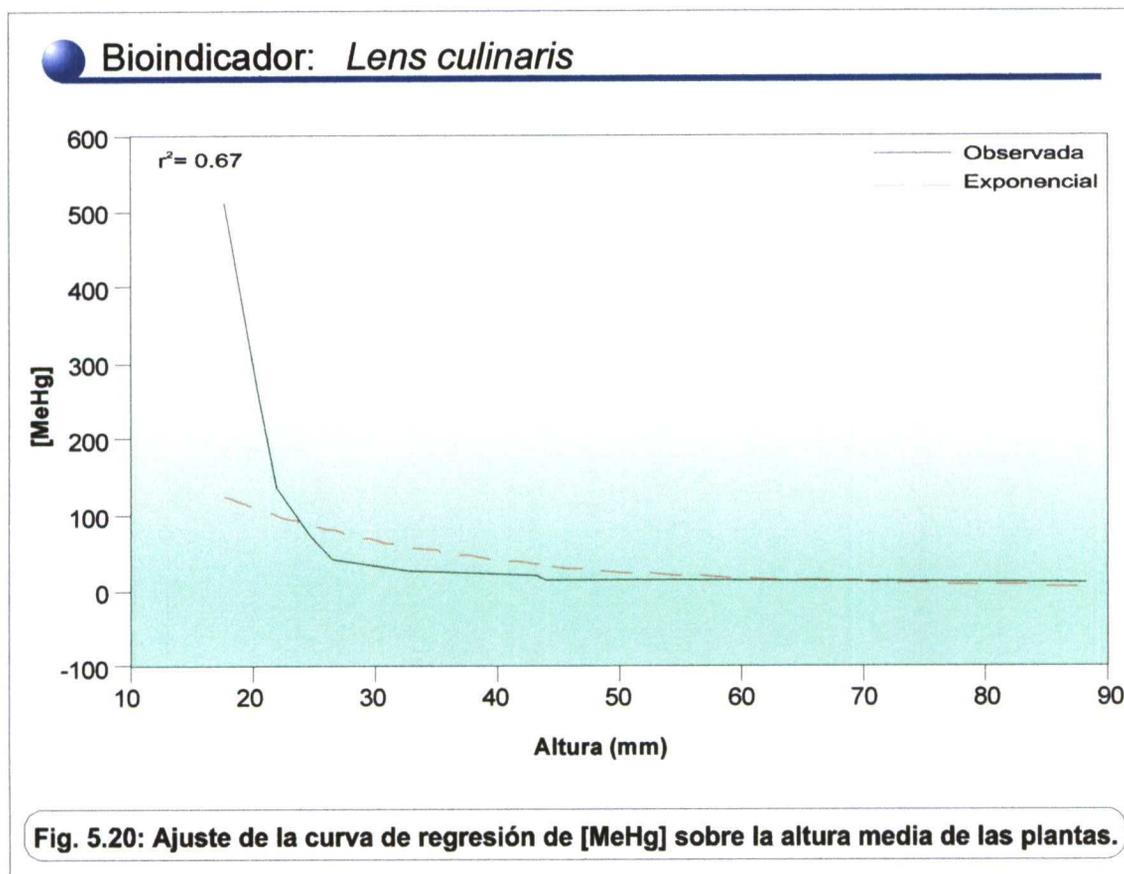
Dilución A	Dilución B	Diferencia media (A-B)	±DS	p
Control	1.95	33.23	1.664	0.001
	3.90	44.12	1.664	0.001
	7.81	44.51	1.664	0.001
	15.6	54.63	1.664	0.001
	31.25	61.33	1.664	0.001
	62.5	64.48	1.664	0.001
	125	68.27	1.664	0.001
	250	73.98	1.664	0.001
	500	74.94	1.664	0.001
1.95	3.90	10.89	1.664	0.001
3.90	7.81	0.39	1.664	0.001
7.81	15.6	10.12	1.664	0.001
15.6	31.25	6.70	1.664	0.002
31.25	62.5	3.15	1.664	0.666
62.5	125	3.79	1.664	0.069
125	250	5.71	1.664	0.001
250	500	0.96	1.664	0.983

Tabla 5.XV: Comparaciones múltiples de la altura de *L. culinaris* (Estadístico de Tamhane)

La fig. 5.19 muestra las diferencias de altura media de las plantas sin considerar el factor germinación.

La altura media (A) de la lenteja germinada se distribuyó normalmente ($z = 0.61$; $p = 0.84$) y guardó en la correlación de [MeHg] sobre la altura media inversa y significativa, con un mejor ajuste exponencial ($r^2 = 0.67$; $gl = 8$; $p = 0.007$) (Fig. 5.20). De forma que:

$$[\text{MeHg}] = 298.1 e^{0.05 (A \text{ } L \text{ } culinaris)}$$



5.6.4. Bioindicador: *Vicia faba*

Muestra: Los resultados generales obtenidos de las 220 semillas de habas plantadas y distribuidas en un grupo control ($n = 40$; ppm MeHg = 0) y 9 concentraciones progresivas de MeHg (rango 1.95 - 500 ppm; $n/_{(concentación)} = 20$) se muestran en la tabla 5.XVI.

Bioindicador: *Vicia faba*

Longitud del tallo (mm)

Nº	Dilución MeHg									
	Control	1,95	3,9	7,81	15,6	31,3	62,5	125	250	500
1	253	250	210	232	205	215	182	122	41	0
2	230	200	195	207	192	209	180	87	36	0
3	219	193	190	182	152	197	177	85	34	0
4	210	170	187	173	146	190	138	74	32	0
5	209	168	177	155	114	126	130	66	21	0
6	202	162	168	134	111	117	126	65	0	0
7	197	159	163	122	107	72	114	60	0	0
8	192	141	132	114	82	72	102	54	0	0
9	186	131	132	96	63	70	92	48	0	0
10	185	92	110	92	53	61	73	30	0	0
11	183	75	98	80	42	50	68	25	0	0
12	182	62	97	68	40	42	65	20	0	0
13	175	59	93	56	39	41	59	18	0	0
14	170	55	82	55	37	36	36	16	0	0
15	167	53	71	36	22	24	35	0	0	0
16	162	61	63	21	20	23	31	0	0	0
17	151	41	35	0	0	16	30	0	0	0
18	146	35	32	0	0	0	0	0	0	0
19	145	27	30	0	0	0	0	0	0	0
20	142	0	30	0	0	0	0	0	0	0
21	142									
22	141									
23	134									
24	122									
25	121									
26	117									
27	106									
28	96									
29	96									
30	96									
31	81									
32	75									
33	72									
34	60									
35	56									
36	51									
37	47									
38	38									
39	32									
40	0									
Total	40	20								

Tabla 5.XVI: Germinación y altura del tallo (mm) de *V.faba*

5.6.4.1. Germinación

De las 220 semillas de habas plantadas, no germinó el 25.9%. El mayor porcentaje de germinación se obtuvo en la concentración 3.90 ppm (100 %) y el menor en la concentración 500 ppm (0 %). Los porcentajes en las diferentes concentraciones variaron significativamente ($\chi^2 = 108.6$; gl = 9; $p < 0.001$) (Tabla 5.XVII)

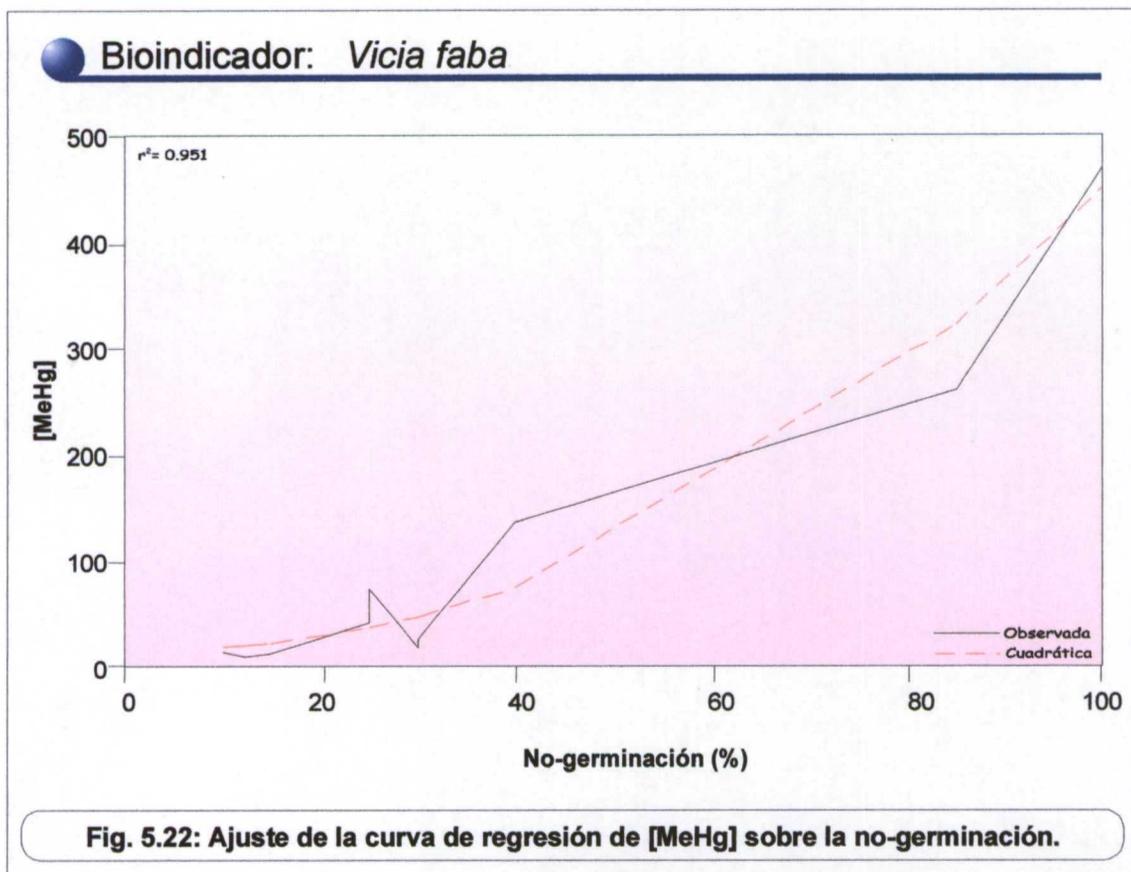
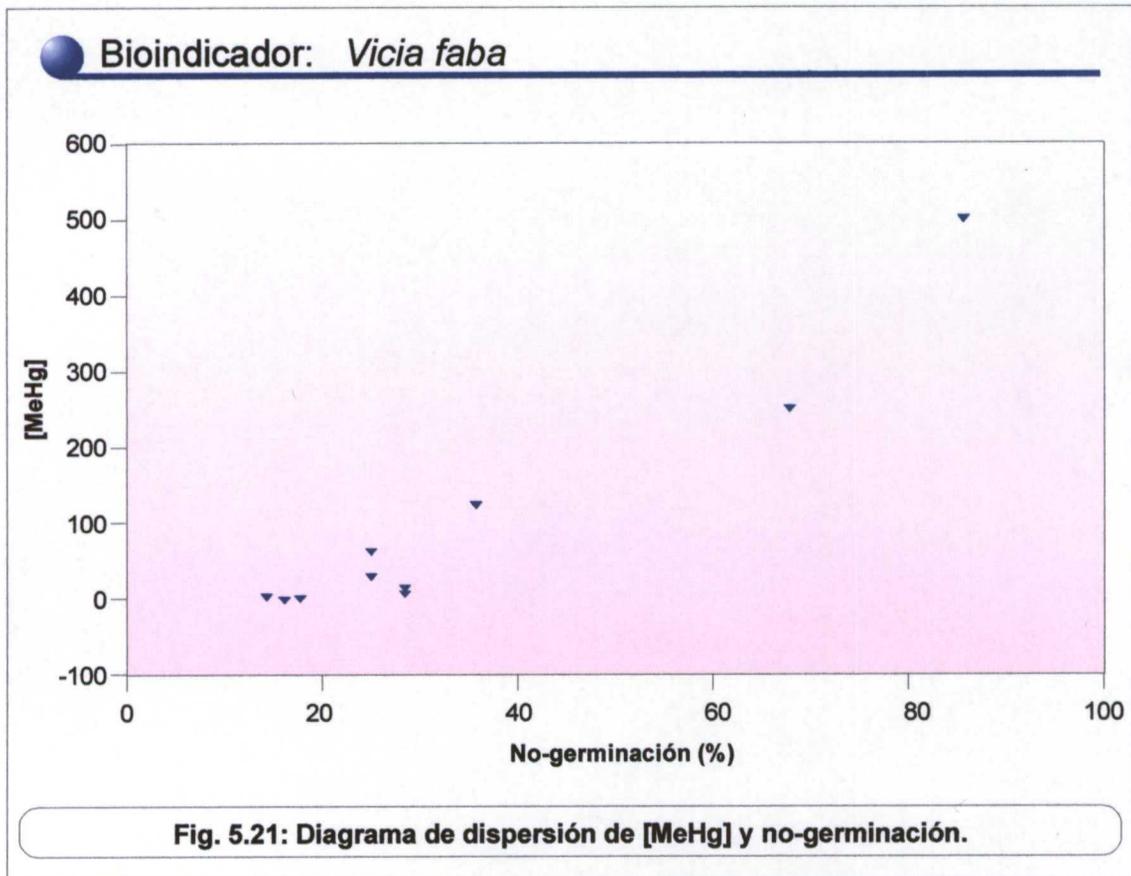
Bioindicador: Vicia faba

			Germinación		Total
			si	no	
[MeHg]	control	N	39	1	40
		(%)	97,5%	2,5%	
	[1.9]	N	19	1	20
		(%)	95,0%	5,0%	
	[3.9]	N	20		20
		(%)	100,0%		
	[7.8]	N	16	4	20
		(%)	80,0%	20,0%	
	[15.6]	N	16	4	20
		(%)	80,0%	20,0%	
	31.25	N	17	3	20
		(%)	85,0%	15,0%	
	[62.5]	N	17	3	20
		(%)	85,0%	15,0%	
	[125]	N	14	6	20
		(%)	70,0%	30,0%	
	[250]	N	5	15	20
		(%)	25,0%	75,0%	
	[500]	N		20	20
		(%)		100,0%	
Total		N	163	57	220
		(%)	74,1%	25,9%	100,0%

Tabla 5.XVII: Porcentajes de germinación de V. Faba

Los porcentajes de germinación del haba se ajustaron a una distribución normal ($z = 0.94$; $p = 0.34$). El estudio de regresión de [MeHg] sobre la inhibición germinativa (IG), cuyo diagrama de dispersión muestra la Fig. 5.21, mostró una correlación directa y significativa, con un mejor ajuste logrado mediante la curva cuadrática ($r^2 = 0.965$; gl = 7; $p < 0.001$) (Fig. 5.22). De forma que:

$$[\text{MeHg}] = 19.718 - 0.558 (\text{IG}_{V. faba}) - 0.048 (\text{IG}_{V. faba})^2$$



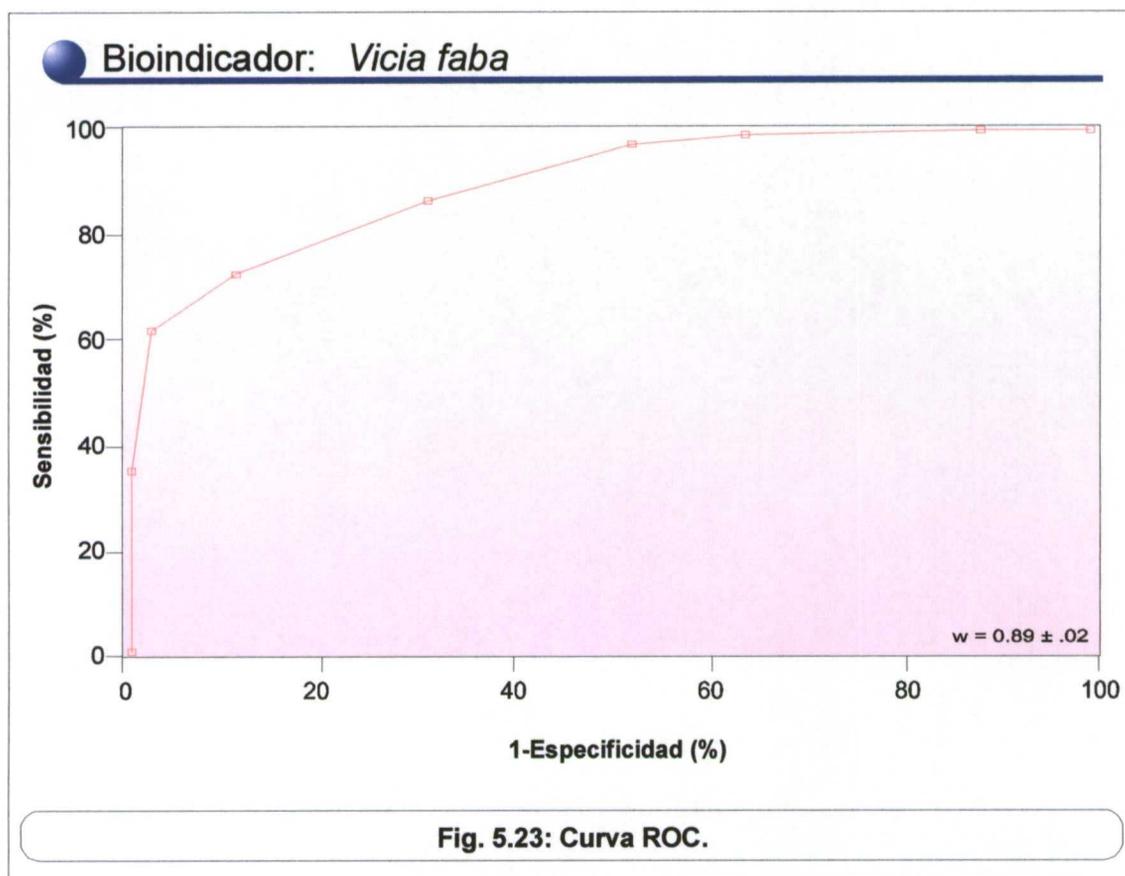
Análisis de riesgos de no-germinación

La tabla 5.XVIII muestra el modelo regresivo y el análisis de riesgos. Contrastados con el control se comportaron como factores significativos de riesgo las concentraciones 7.8 ppm (OR = 9.75; IC95% = 1.01-94.1) , 15,6 ppm (OR = 9.75; IC95% = 1.01-94.1) y a partir de la 125 ppm, crecieron significativa y exponencialmente. La concentración 3.90 ppm se comportó como factor de protección con OR indeterminado al germinar la totalidad de las semillas. La concentración 500 ppm fue por el contrario letal , asimismo con OR indeterminado.

VARIABLE	β	ES	OR	IC 95%
Concentración				
Control	-	-	1	-
1.95	0.719	1.44	2.05	0.12 – 34.6
3.90	- 6.539	36.7	ind	ind
7.81	2.272	1.15	9.75	1.01 – 94.1
15.6	2.277	1.15	9.75	1.01 – 94.1
31.25	1.929	1.19	6.88	0.66 – 71.0
62.5	1.929	1.19	6.88	0.66 – 71.0
125	2.816	1.12	16.71	1.84 – 151.3
250	4.762	1.13	117.0	12.6 – 1085.9
500	13.866	36.74	ind	ind
β_0	- 3.663	1.01	-	-

Tabla 5.XVIII: Modelo regresivo de no-germinación de *V. Faba*
 (-2LL = 138.0; bondad de ajuste = 180.0; ; χ^2 del modelo = 113.9; gl = 8; p <0.001)

Sobre las predicciones individuales del modelo regresivo se calculó, tras obtener una tasa de no-germinación del 25.9, el punto de corte óptimo (0.30) cuya matriz de clasificación acreditó: sensibilidad = 0.614; especificidad = 0.969; valor predictivo positivo = 0.875; valor predictivo negativo = 0.078; clasificación correcta: 0.877. La curva ROC obtenida mostró un área bajo ella de 0.89 ± 0.02 . (Fig. 5.23).



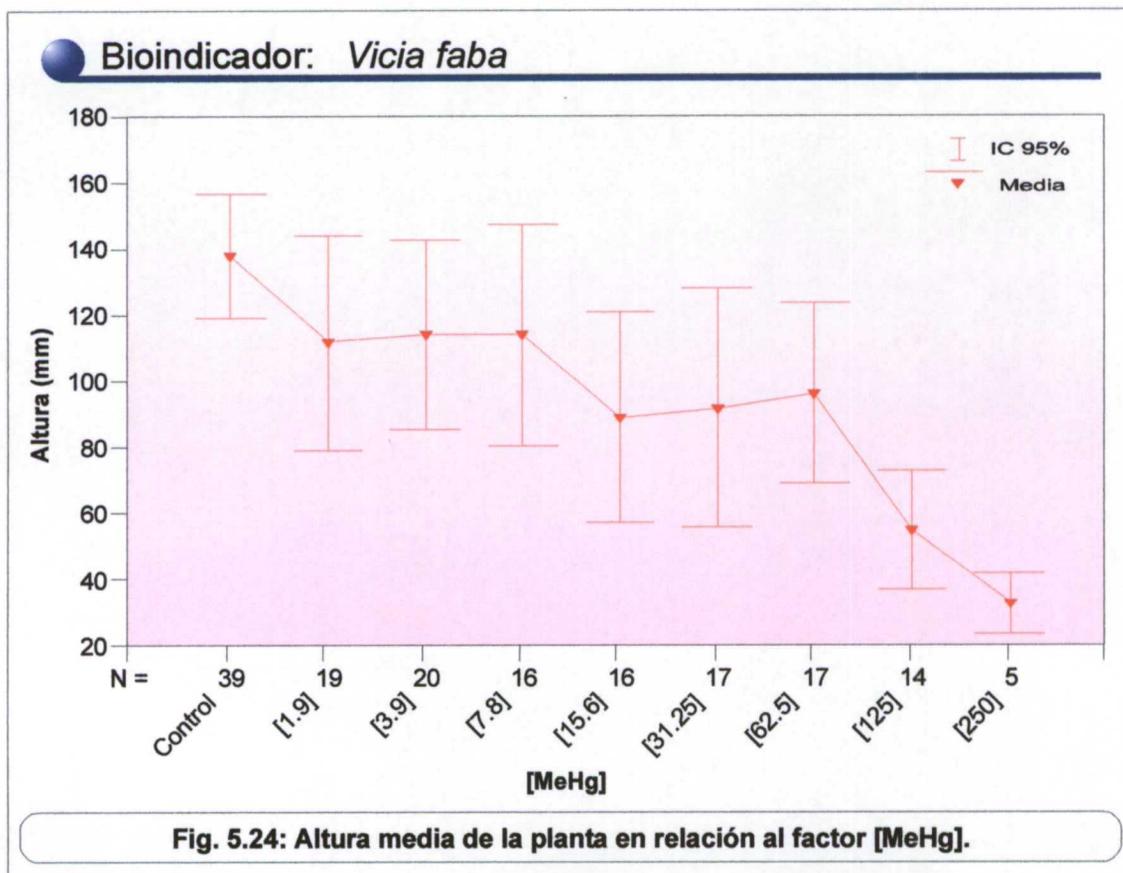
5.6.4.2. Crecimiento

La mayor altura media fue alcanzada por el control (137.9 ± 58.4 mm). La concentración 500 ppm fue letal. No se pudo demostrar que la altura del haba fuese significativamente influida por la interacción de las diferentes concentraciones utilizadas y la germinación ($F = 1.09$; $p = 0.36$). Por el contrario, cuando se analizaron las diferencias de altura (tabla 5.XIX) sin considerar el efecto del factor germinación (fig.5.24) se demostró una muy elevada significación ($F = 4.18$; $p < 0.001$). La tabla 5.XX muestra las diferencias intergrupos.

ALTURA

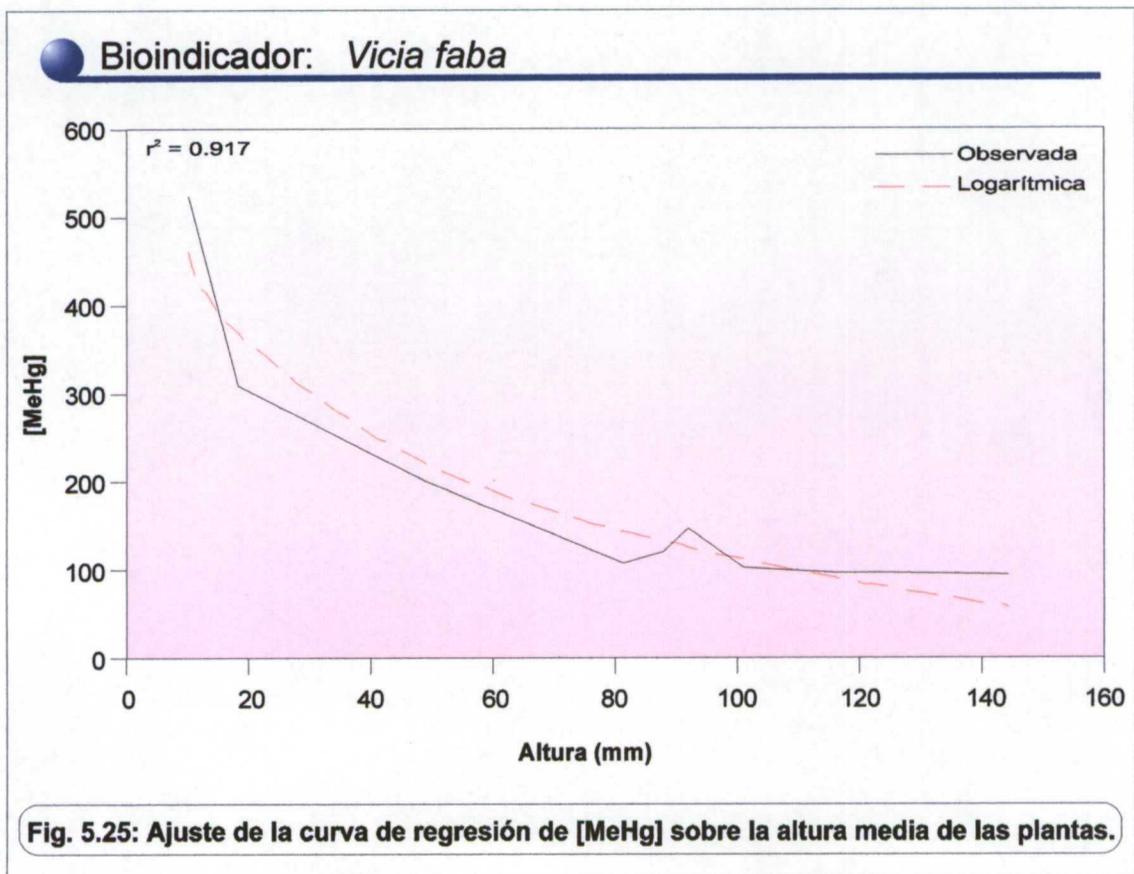
	N	Media	±DS
control	39	137.92	58.49
1.9	19	111.79	67.28
3.9	20	114.25	61.34
7.8	16	113.94	62.44
15.6	16	89.06	59.89
31.25	17	91.82	70.10
62.5	17	96.35	52.89
125	14	55.00	31.27
250	5	32.80	7.40
Total	163	105.33	63.20

Tabla 5.XIX: Alturas medias (mm) de *V. Faba* y [MeHg]



Concentración A	Concentración B	Dif ^a (A-B)	±DS	p
Control	1.95	26.13	16.43	0.999
	3.90	23.67	16.15	0.998
	7.81	23.99	17.4	1.0
	15.6	48.46	17.4	0.30
	31.25	46.10	17.0	0.60
	62.5	41.57	17.0	0.38
	125	82.92	18.3	< 0.001
	250	105.12	27.9	< 0.001
1.95	3.90	-2.46	18.8	1.00
3.90	7.81	0.31	19.7	1.00
7.81	15.6	24.88	20.7	1.00
15.6	31.25	-2.76	20.4	1.00
31.25	62.5	-4.53	20.1	1.00
62.5	125	41.3	21.2	0.350
125	250	22.2	30.6	0.59
250	500	32.8	-	-

Tabla 5.XX: Comparaciones múltiples de la altura de plantas germinadas de *V. faba* (Estadístico de Tahmane)



Las alturas medias de las habas germinadas (**A**) se ajustaron a la normalidad ($z = 0.59$; $p = 0.86$) y guardaron, en la regresión lineal de [MeHg] sobre ellas, una correlación inversa y significativa, con un mejor ajuste exponencial, ($r^2 = 0.917$; $gl = 8$; $p < 0.001$) (fig. 5.25). De forma que:

$$[\text{MeHg}] = 526.35 - e^{0.029} (\text{AV. faba})$$

5.6.5. Resultados del estudio comparativo de las cuatro especies botánicas:

Muestra: Un total de 2123 de los cuatro tipos de semillas en las diferentes concentraciones, durante el correspondiente tiempo descrito de estudio y cuya distribución respecto a concentraciones y tipo de semilla muestra la tabla 5.XXI y, en cuanto a concentraciones y germinación, la tabla 5.XXII.

	Bioindicador				Total
	L. culinaris	H. vulgaris	Z. mais	V. faba	
	N	N	N	N	N
[MeHg] control	100	60	60	40	260
[1.9]	100	45	42	20	207
[3.9]	100	45	42	20	207
[7.8]	100	45	42	20	207
[15.6]	100	45	42	20	207
31.25	100	45	42	20	207
[62.5]	100	45	42	20	207
[125]	100	45	42	20	207
[250]	100	45	42	20	207
[500]	100	45	42	20	207
Total	1000	465	438	220	2123

Tabla 5.XXI: Distribución de las 2123 semillas en relación al tipo de bioindicador

	Germinación				Total	
	Si		No			
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
PPM control	249	95.8%	11	4.2%	260	12.2%
1.9	190	91.8%	17	8.2%	207	9.8%
3.9	194	93.7%	13	6.3%	207	9.8%
7.8	186	89.9%	21	10.1%	207	9.8%
15.6	186	89.9%	21	10.1%	207	9.8%
31.25	175	84.5%	32	15.5%	207	9.8%
62.5	155	74.9%	52	25.1%	207	9.8%
125	119	57.5%	88	42.5%	207	9.8%
250	36	17.4%	171	82.6%	207	9.8%
500	16	7.7%	191	92.3%	207	9.8%
Total	1506	70.9%	617	29.1%	2123	100%

Tabla 5.XXII: Porcentajes de germinación de las 2123 semillas

5.6.5.1. Germinación

La tabla 5.XXII muestra la distribución total de la germinación de semillas en cada concentración.

Utilizando como variables independientes las 9 concentraciones de MeHg (rango entre 1.9 y 500 ppm), contrastadas contra el control (0 ppm) y las especies botánicas, contrastadas con aquella de germinación menos inhibida (maíz), se obtuvo el siguiente modelo logístico predictivo de la probabilidad de no-germinación ($Pr_{no-germinación}$) estimada a través de la función Z :

$$Z = - 4.194 + \beta_1 (\text{Bioindicador}_{si = 1; no = 0}) + \beta_2 (\text{Concentración}_{si = 1; no = 0})$$

La tabla 5.XXIII, muestra los valores que toman los coeficientes β de las covariables en función de la presencia de las categorías de las variables independientes así como su desviación standard. De forma que :

$$(Pr_{no-germinación}) = [1 / (1 + e^{-z})]$$

de donde:

$$(Pr_{no-germinación}) = [1 / (1 + e^{-[-4.194 + \beta_1 (\text{Bioindicador}_{si = 1; no = 0}) + \beta_2 (\text{Concentración MeHg}_{si = 1; no = 0})])}]$$

$$(-2LL = 1446.6; \text{bondad de ajuste} = 2326.7; \text{gl} = 12; \chi^2 \text{ del modelo} = 1112.4; p < 0.001)$$

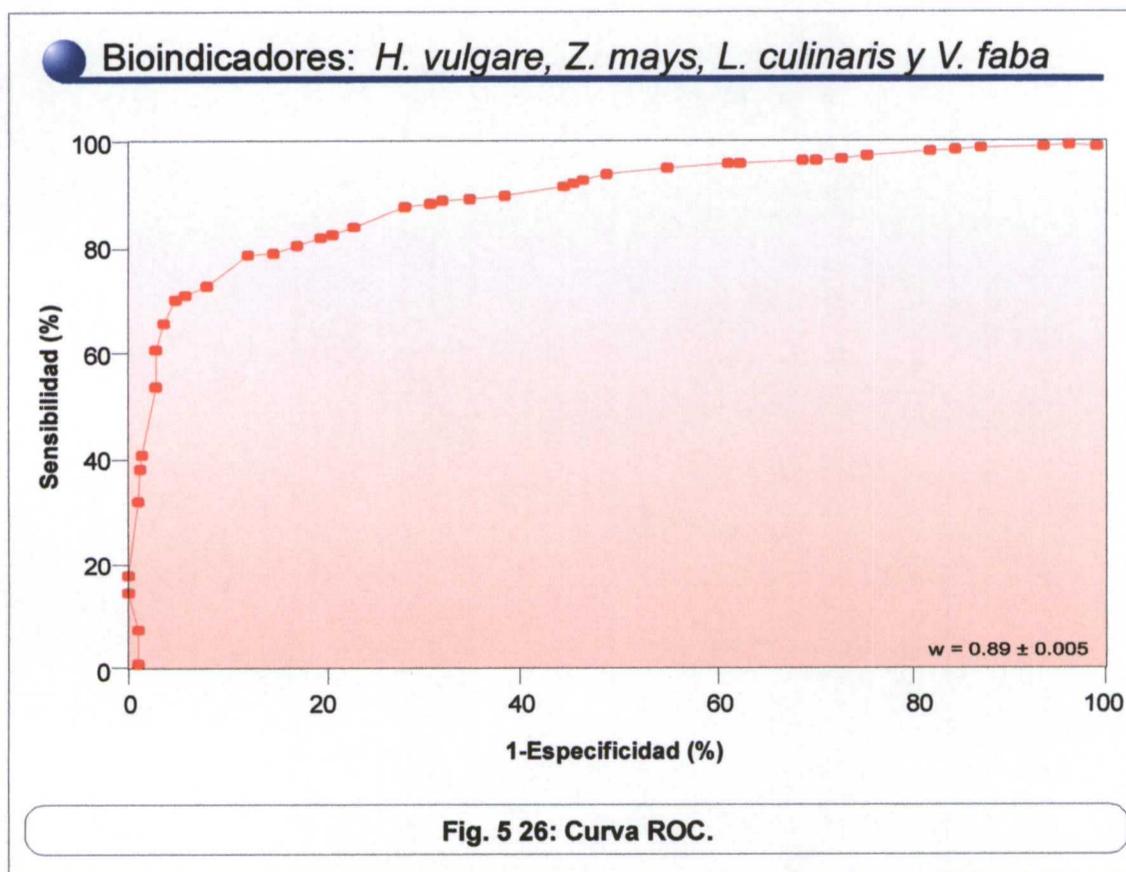
En la misma tabla se aprecian los odds-ratios ajustados ($OR_{aj.}$) con su intervalo de confianza. En relación a las semillas, los riesgos ajustados de no-germinación, contrastados con el maíz, se incrementaron significativamente y en progresión creciente, siendo de 1.64 (IC 95% = 1.11 – 2.44) para la lenteja, 2.02 (IC 95% = 1.16 – 3.51) para el haba y 8.05 (IC 95% = 5.21 – 12.4) para la cebada.

VARIABLE	β	DS	OR _A	IC 95%
Bioindicador				
<i>Zea mays</i>	-	-	1	-
<i>Lens culinaria</i>	0.493	0.20	1.64	1.11 - 2.44
<i>Vicia faba</i>	0.708	0.28	2.02	1.16 - 3.51
<i>Hordeum v.</i>	2.085	0.22	8.05	5.21 - 12.41
Concentración				
Control	-	-	1	-
1.95	0.769	0.40	2.15	0.97 - 4.80
3.90	0.464	0.42	1.59	0.68 - 3.69
7.81	1.018	0.39	2.76	1.27 - 5.99
15.6	1.018	0.39	2.76	1.27 - 5.99
31.25	1.543	0.37	4.68	2.25 - 9.73
62.5	2.223	0.35	9.23	4.57 - 18.66
125	3.122	0.35	22.70	11.38 - 45.28
250	5.143	0.37	171.36	82.28 - 356.90
500	6.092	0.41	442.70	195.1 - 1004.4
β_0	- 4.194	0.36	-	-

Tabla 5.XXIII: Modelo regresivo logístico de la no-germinación en los cuatro bioindicadores botánicos. (OR_{aj} = odds-ratio ajustado; ES = error standard; IC = intervalo de confianza)

En relación a las concentraciones tóxicas y contrastando con el riesgo del grupo control (ppm MeHg = 0), todas las concentraciones se comportaron como factores de riesgo si bien las significaciones estadísticas de los riesgos ajustados comenzaron a aparecer en la concentración 7.81 ppm (ORA = 2.76; IC95% = 1.97 – 5.99) y creciendo con tendencia exponencial hasta la concentración 500 ppm (ORA = 442 .70; IC95% = 195.1 – 1004.4).

Sobre una tasa de no-germinación total de 0.29 y con las predicciones individuales obtenidas del modelo se determinó el punto de corte óptimo que fue de 0.41 y acreditó los siguientes índices: Sensibilidad = 0.699; Especificidad = 0.952; Índice predictivo (+) = 0.85; Índice predictivo (-) = 0.88; Eficacia = 0.88. Asimismo se construyó la curva ROC ($W = 0.89 \pm 0.01$) que muestra la figura 5.26.



Capacidad biomedidora a través de la inhibición de la germinación

Cuando se aplicó regresión lineal múltiple paso a paso (“stepwise”) para analizar cual o cuales de las especies botánicas predecía mejor a través de sus tasas de no germinación (NG), la variable dependiente [MeHg], el proceso seleccionó exclusivamente al haba ($r = 0.953$; $r^2 = 0.908$; $p < 0.001$). Al ajustar los puntos del diagrama de dispersión a las diferentes curvas, se evidenció que la curva cuadrática era la que conseguía un mejor coeficiente de determinación ($r^2 = 0.951$; $p < 0.001$). De forma que:

$$[\text{MeHg}] = 19.718 - 0.558 (\text{NG}_{\text{V. Faba}}) + 0.048 (\text{NG}_{\text{V. Faba}}^2)$$

Los ajustes de las curvas de regresión de las restantes especies botánicas, anteriormente mostrados, clasificó ordinalmente en segundo lugar al maiz en ajuste cuadrático ($r^2 = 0.938$; $gl = 7$; $p < 0.001$), en tercero a la cebada en ajuste exponencial ($r^2 = 0.911$; $gl = 8$; $p < 0.001$) y finalmente a la lenteja en ajuste cuadrático ($r^2 = 0.906$; $gl = 7$; $p < 0.001$).

5.6.5.2. Crecimiento

La tabla 5.XXIV muestra la distribución de las 1506 semillas germinadas en relación con los cuatro tipos de plantas y las diferentes concentraciones.

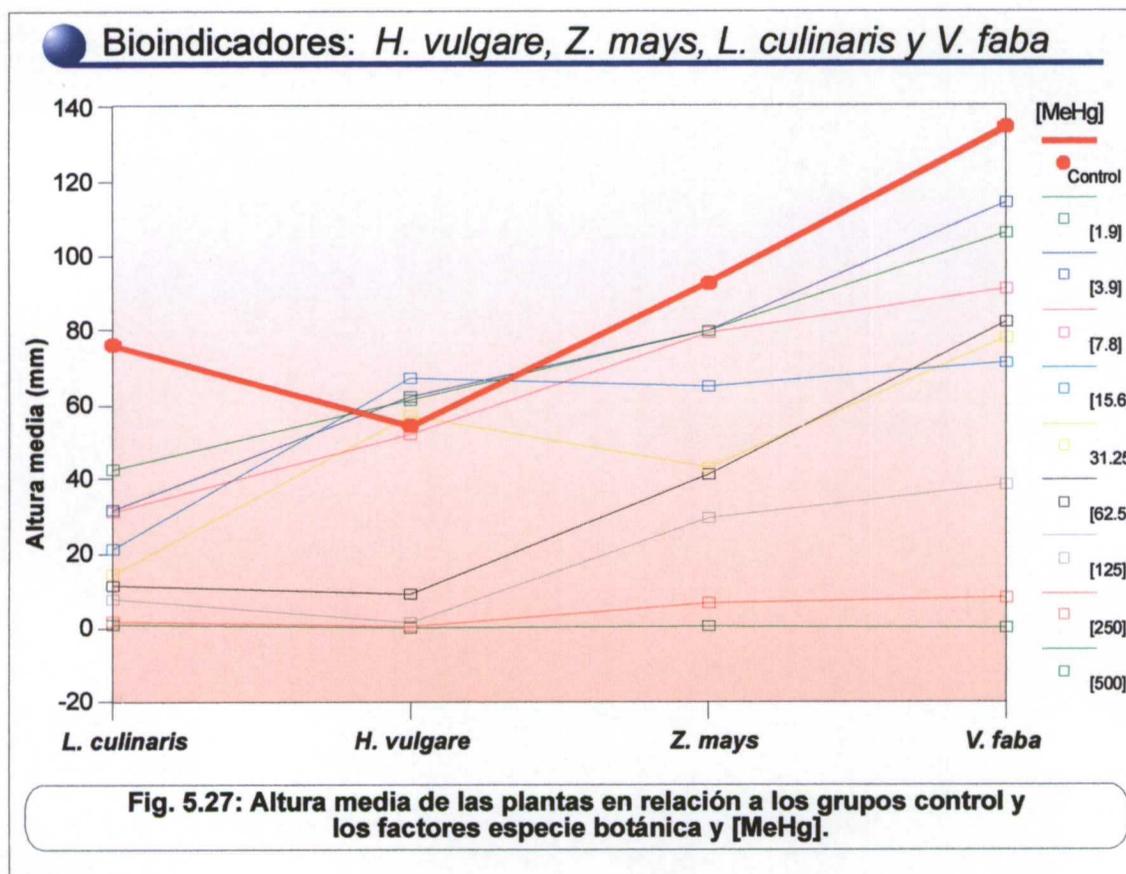
Altura media de las semillas germinadas

Dependent Variable: ALTURA

[MeHg]	Bioindicador	Media	± DS	N
control	Lens c.	78,29	28,82	97
	Hordeum v.	58,00	44,85	56
	Zea mais	97,54	29,25	57
	Vicia faba	137,92	58,49	39
	Total	87,47	45,72	249
1.9	Lens c.	44,49	11,55	96
	Hordeum v.	78,48	38,25	35
	Zea mais	83,70	28,22	40
	Vicia faba	111,79	67,28	19
	Total	65,73	38,29	190
3.9	Lens c.	33,85	12,01	94
	Hordeum v.	69,83	43,20	40
	Zea mais	83,70	28,22	40
	Vicia faba	114,25	61,34	20
	Total	59,84	41,86	194
7.8	Lens c.	33,08	11,85	95
	Hordeum v.	65,11	42,49	36
	Zea mais	85,23	18,22	39
	Vicia faba	113,94	62,44	18
	Total	57,17	39,40	188
15.6	Lens c.	22,91	11,47	83
	Hordeum v.	83,97	29,59	38
	Zea mais	66,15	34,28	41
	Vicia faba	89,06	59,89	16
	Total	49,95	39,49	188
31.25	Lens c.	16,42	9,34	89
	Hordeum v.	75,44	34,24	34
	Zea mais	51,63	37,39	35
	Vicia faba	91,82	70,10	17
	Total	42,25	42,50	175
62.5	Lens c.	14,69	8,04	78
	Hordeum v.	21,63	17,81	19
	Zea mais	42,05	37,43	41
	Vicia faba	98,35	52,89	17
	Total	31,74	37,05	155
125	Lens c.	11,98	5,42	64
	Hordeum v.	32,00	21,21	2
	Zea mais	31,56	31,71	39
	Vicia faba	55,00	31,27	14
	Total	23,80	25,75	119
250	Lens c.	10,32	6,18	19
	Hordeum v.	20,00	.	1
	Zea mais	26,18	18,11	11
	Vicia faba	32,80	7,40	5
	Total	18,56	13,57	38
500	Lens c.	7,69	2,63	13
	Zea mais	8,67	1,53	3
	Total	7,88	2,45	16
Total	Lens c.	32,51	24,81	738
	Hordeum v.	66,46	41,15	259
	Zea mais	67,54	38,59	346
	Vicia faba	105,33	63,20	163
	Total	54,28	44,09	1506

Tabla 5.XXIV: Altura media de las plantas germinadas en relación a cada especie botánica

Las varianzas fueron heterogéneas ($F = 34.9$; $gl = 37$; $p < 0.001$). Las diferencias de alturas medias (Fig. 5.27) se alteraron significativamente por la interacción de las diferentes concentraciones de MeHg y las cuatro plantas ($F = 8.38$; $gl = 25$; $p < 0.001$).



A excepción del maíz versus cebada, las comparaciones múltiples de altura mostraron diferencias significativas entre la altura media alcanzada por las diferentes plantas (tabla 5.XXV). También fueron significativas todas las diferencias entre las alturas medias de todas las concentraciones tóxicas con el grupo control (tabla 5.XXVI).

(I) Bioindicador	(J) Bioindicador	Diferencia media (I-J)	± DS	p
Lens c.	Hordeum v.	-33,96	2,192	< 0.001
	Zea mais	-35,03	1,977	< 0.001
	Vicia faba	-72,82	2,627	< 0.001
Hordeum v.	Lens c.	33,96	2,192	< 0.001
	Zea mais	-1,07	2,494	1.000
	Vicia faba	-38,87	3,034	< 0.001
Zea mais	Lens c.	35,03	1,977	< 0.001
	Hordeum v.	1,07	2,494	1.000
	Vicia faba	-37,79	2,883	< 0.001
Vicia faba	Lens c.	72,82	2,627	< 0.001
	Hordeum v.	38,87	3,034	< 0.001
	Zea mais	37,79	2,883	< 0.001

Tabla 5.XXV: Diferencias de altura en función del factor tipo de bioindicador. (Estadístico de Tahmane)

Concentración A	Concentración B	(A-B) media	±DS	p
Control	1.95	21.7	2.9	< 0.001
	3.90	27.6	2.9	< 0.001
	7.81	30.3	2.9	< 0.001
	15.6	37.5	2.9	< 0.001
	31.25	45.2	2.9	< 0.001
	62.5	55.7	3.1	< 0.001
	125	63.6	3.3	< 0.001
	250	68.9	5.4	< 0.001
	500	79.6	7.8	< 0.001
1.95	3.90	5.9	3.0	0.99
3.90	7.81	2.6	3.1	1.00
7.81	15.6	7.2	3.1	0.97
15.6	31.25	7.7	3.1	0.97
31.25	62.5	10.5	3.3	0.53
62.5	125	7.9	3.6	0.82
125	250	5.2	5.7	0.99
250	500	10.6	9.1	0.002

Tabla 5.XXVI: Comparaciones múltiples de la altura de las 1506 plantas. (Estadístico de Tahmane)

Evaluación de la capacidad biomedidora a través del desarrollo de las plantas

Cuando se aplicó regresión lineal múltiple paso a paso ("stepwise") para analizar cual o cuáles de las plantas predecía mejor, a través del desarrollo en altura (A) de las mismas, la variable dependiente [MeHg], el proceso seleccionó exclusivamente al maíz ($r = -0.864$; $r^2 = 0.747$; $p < 0.001$). Al ajustar los puntos del diagrama de dispersión a las diferentes curvas, se evidenció que la curva cuadrática era la que conseguía un mejor coeficiente de determinación ($r^2 = 0.976$; $p < 0.001$). De forma que:

$$[\text{MeHg}] = 651.09 - 15.18 (A_{Z. \text{mays}}) + 0.088 (A_{Z. \text{mays}})^2$$

Los ajustes de las curvas de regresión de las restantes plantas, anteriormente mostradas, clasificó ordinalmente en segundo lugar al haba en ajuste exponencial ($r^2 = 0.917$; $gl = 7$; $p < 0.001$), en tercero a la cebada en ajuste cuadrático ($r^2 = 0.905$; $gl = 8$; $p < 0.001$) y finalmente a la lenteja en ajuste exponencial ($r^2 = 0.670$; $gl = 8$; $p = 0.007$).

La fig. 5.28 muestra los correspondientes diagramas de dispersión así como las curvas ajustadas resultantes.

Bioindicadores: *H. vulgare*, *Z. mays*, *L. culinaris* y *V. faba*

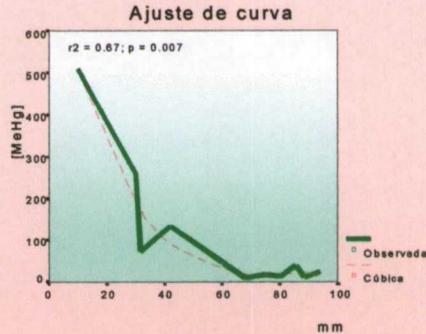
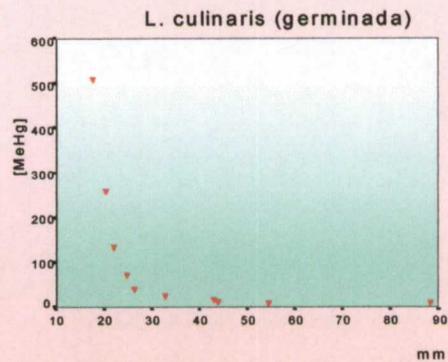
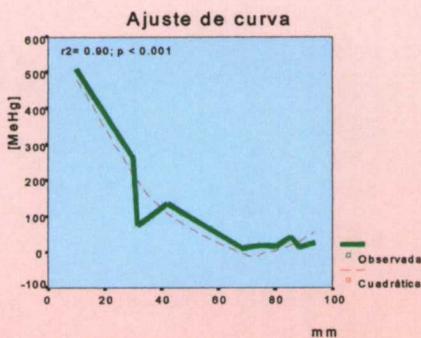
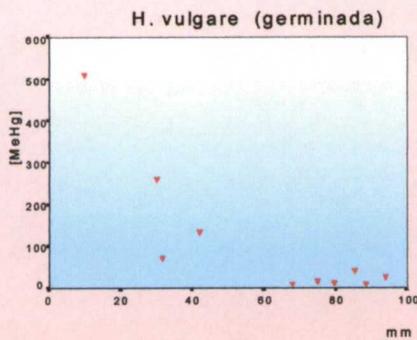
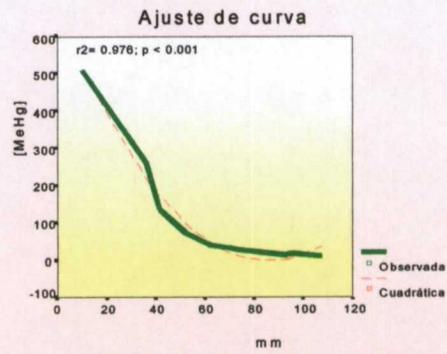
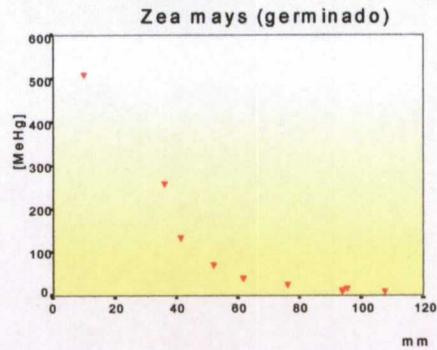
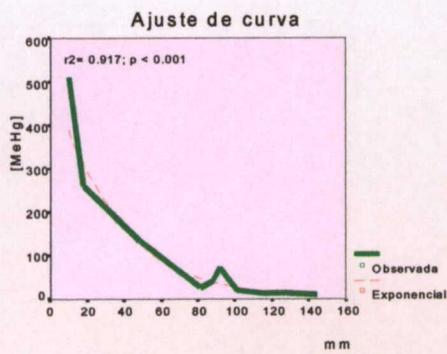
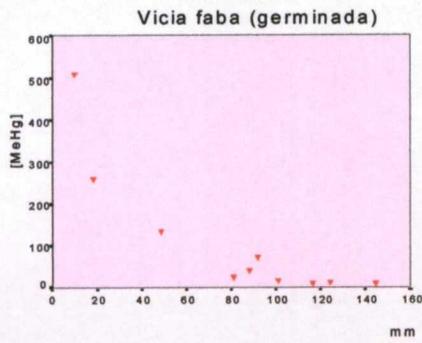


Fig. 5.28: Ajuste de las curvas de regresión de la [MeHg] sobre la altura media alcanzada por las diferentes especies botánicas. Se muestran los diagramas de dispersión y el mejor ajuste conseguido de las curvas obtenidas.

5.7. DISCUSIÓN

Está suficientemente probada la toxicidad del mercurio orgánico a través de la ingestión de plantas contaminadas (Smith et al., 1976; Al-Muftly et al., 1976; Al-Tikriti et al., 1976; Almeida et al., 1976). Sin embargo, no se conocen con exactitud los procesos orgánicos que en ellas la generan. Se han invocado factores genotóxicos (Patra et al., 2000; Subhadra et al., 1994; Panda et al., 1988; Bizili et al., 2000), hormonales (Czuba, 1987) y ambientales (fotoperiodo y temperatura) (Maury-Brachet et al., 1990).

Asimismo, se han descrito efectos citotóxicos sobre las proteínas (fitoquelatinas) y sobre las características de la permeabilidad de las membranas celulares (Patra et al., 2000; Panda et al. 1988; Czuba et al., 1987), con alteraciones microscópicas consistentes en disrupción de los microtúbulos celulares (Czuba et al., 1987), mayor presencia de micronúcleos en las células meristemáticas radiculares (Panda et al., 1988) y alteraciones macroscópicas que afectan al desarrollo de la planta (Ribeyre et al., 1994). Estas alteraciones dependen del tiempo de exposición y de la concentración del tóxico.

Los estudios medioambientales tienden a dirigirse al estudio de plantas, predominantemente silvestres y de escaso interés bromatológico, tales como *Elodea densa*, *Ludwigia natans*, *Lysimachia nummularia*, *Hygrophila onogaria*, *Arabidopsis thaliana*, *Eichhornia crassipes*, etc. Son también objeto de gran interés las investigaciones relacionadas con su capacidad detoxicadora mercurial (Czuba, 1987; Ganther et al., 1972), así como las que atañen a la ingeniería genética (Bizili et al., 2000). Entre las plantas de interés bromatológico se ha estudiado la cebada (*Hordeum vulgare*) (Patra et al. 2000; Subhadra & Panda, 1994), el ajo (*Allium*) (Panda et al., 1995), la zanahoria silvestre (*Daucus carota*) (Czuba, et al., 1987) y la lechuga (*Lactuca sativa*) (Czuba, 1987).

Si bien la ecotoxicología del mercurio y la toxicidad a nivel molecular son aspectos relevantes en la consecución de un desarrollo sostenible, no lo son menos los efectos tóxicos indirectos que Truhaut (1975) denomina toxicidad "por relevos", consistente en la transmisión del mercurio mediante las plantas a la cadena alimentaria de consumo animal o humano, que se agrava por el efecto de bioacumulación en los organismos situados por encima en la pirámide alimentaria. En tal aspecto, tenemos como ejemplo los envenenamientos ocasionados en Irak y Paquistán por consumo de trigo cuyas semillas habían sido tratadas previamente con fungicidas que contenían derivados de mercurio (Smith et al., 1976; Al-Muftly et al., 1976; Al-Tikriti et al., 1976; Almeida et al., 1976).

En este trabajo se ha optado por el intento de evaluar el potencial bioindicador toxicológico de plantas autóctonas, primero de gran transcendencia bromatológica

veterinaria y humana y segundo, de especies habituales en la Comunidad Autónoma de Madrid, sorprendiéndonos que, hasta donde llega nuestro conocimiento, no hayamos podido encontrar en la literatura mundial o en la experiencia de las Instituciones específicas, trabajos que permitan contrastar nuestros resultados con los de otros autores. Asimismo, sería de esperar que, con independencia del interés ecotoxicológico, los estudios cuali y semi-cuantitativos del efecto de los metales pesados en la agricultura despertasen mayor interés. Entre otras circunstancias porque, como se deducirá más adelante del análisis de su efecto lesivo sobre el desarrollo de la biomasa correspondiente, pueden deducirse conclusiones de indudable valor económico en el aprovechamiento agrario.

El presente experimento se inició con unas pruebas piloto de evaluación del biotopo adecuado (Ribeyre, 1994) para el cultivo de las plantas elegidas optando por la siembra en sepiolita. Entendemos que la posterior obtención de un porcentaje de germinación global del 95.8% en las 260 semillas utilizadas como control confirman la bondad de la elección.

La **germinación** de los cuatro tipos de plantas se ve afectada significativamente por el metilmercurio siendo la semilla de cebada, desde un punto de vista muy general, la más perjudicada (tasa de inhibición germinativa de la semilla intoxicada del 49.9%) y el maíz el menos (tasa de inhibición germinativa del 23.5%). Ello supondría de entrada una pérdida notable de productividad si una explotación de pastos típicos para el ganado como la cebada, se contamina con mercurio. En una aproximación global y simplista, pero práctica, basta observar la tabla 5.XXVII para concluir lo siguiente: la presencia en la tierra del tóxico reduce cuantitativamente la biomasa a cosechar al afectar severamente al porcentaje de germinación.

El grado de contaminación determinará variaciones en el bio-riesgo al que se ven expuestas las semillas y plantas. La tolerancia al riesgo de las semillas no es homogénea. Mientras que el riesgo de no germinar para la cebada comienza en la concentración 1.95 ppm y se va incrementando hasta llegar a ser letal en la máxima concentración (500 ppm), sucediendo algo similar en el haba, la tolerancia al tóxico del maíz y la lenteja es mucho mayor, comenzando a ser significativa en las concentraciones 250 ppm y 31.25 ppm respectivamente, siendo además predecibles estos riesgos con una fiabilidad en porcentajes que oscilan, según el bioindicador, entre el 74% y el 92% (clasificación correcta). De todos ellos, la lenteja es la que muestra un comportamiento menos predecible.

Semillas (nº)	No-germinación (%)	p
H. vulgare(465)		
Control (60)	6.7	< 0.001
[MeHg] (405)	49.9	
V.faba (220)		
Control (40)	2.5	< 0.001
[MeHg] (405)	31.1	
L. culinaris (1000)		
Control (100)	3.0	< 0.001
[MeHg] (1000)	28.8	
Z. mays (438)		
Control (60)	5.0	< 0.001
[MeHg] (378)	23.5	

Tabla 5.XXVII: Visión global y simplista de la no-germinación de las semillas sanas e intoxicadas con MeHg (Test exacto de Fisher)

El análisis de las 2123 semillas plantadas mediante regresión logística, permite analizar la probabilidad de inhibición germinativa en función del comportamiento de una determinada concentración de metilmercurio (factor de riesgo o factor de protección) tanto en función exclusiva de las categorías ordinales de las concentraciones aplicadas, como en la estimación de su efecto en relación a otros factores o covariables como la especie de semillas utilizadas (odds-ratios ajustados). Así, se ha demostrado que para cualquier concentración tóxica en un rango de 1,95 a 500 ppm y tras haber objetivado previamente que todas las especies son individualmente sensibles al metilmercurio, en tanto que el maíz es la semilla más resistente (categoría de contraste), la de cebada es la de mayor sensibilidad al tóxico, presentando un riesgo de inhibición germinativa 8.05 veces superior al del maíz. Las restantes semillas toleran mejor la contaminación, siendo el riesgo de inhibición del haba doble y el de la lenteja 1.64 veces superior al del maíz.

Al contrastar el factor riego con distintas concentraciones de metilmercurio con la cosecha control regada con agua sin contaminar, se demuestra que, si bien todas las concentraciones tóxicas se comportan como factor de riesgo ($OR_{aj} > 1$), es a partir de la concentración 7.81 ppm donde cualquiera de nuestras semillas plantadas asume significativamente un riesgo 2.76 veces mayor de inhibición germinativa que la regada con agua no contaminada y que el riesgo va creciendo exponencialmente a medida que aumenta la contaminación de forma que el riesgo no-germinativo de la semilla plantada en la concentración 500 ppm llega a ser 442.7 veces mayor (tabla 5.XXIII).

La capacidad biomedidora a través de la germinación se ha estudiado mediante los coeficientes de determinación de la regresión de las tasas de germinación sobre las diferentes concentraciones de metilmercurio. Todas las plantas experimentales se comportan como medidores significativos guardando una correlación fuerte ($r^2 > 0.90$) e inversa. También en esta capacidad biométrica hay diferencias de matiz entre ellas. Mientras que la capacidad predictiva de la cebada se ajusta a una curva exponencial, las restantes plantas se ajustan a una cuadrática. De forma que la acción antigerminativa de una concentración de metilmercurio es estadísticamente semi-cuantificable a través de los porcentajes de no-germinación de las semillas, así como es esperable la forma matemática en la que esa inhibición tiende a manifestarse. La regresión múltiple paso a paso, demuestra que la semilla de mayor potencial biométrico en tal sentido es el haba, dotada de un coeficiente altísimo de determinación ($r^2 = 0.95$; $p < 0.001$), lo que supone que el 95% de la variabilidad total de la concentración de metilmercurio queda explicada por el ajuste cuadrático de la curva de regresión correspondiente.

Así, las cuatro variedades de semillas utilizadas se han comportado mediante su estudio germinativo, como bioindicadoras y biomedidoras significativas tanto del impacto tóxico generado por la contaminación mercurial como agentes estimadores útiles de la probabilidad de "cantidad" de biomasa a cosechar, en función del grado de contaminación mercurial de la huerta o pasto a explotar.

El modelo matemático obtenido de la predicción no germinativa ha acreditado una excelente capacidad predictiva como acredita el área de la curva de recepción operacional ($W = 0.89$) y el elevado porcentaje de acierto (88%) en la clasificación de la inhibición germinativa de las 2123 semillas plantadas.

El **desarrollo** de la planta, también se ve afectado por el metilmercurio incidiendo sobre la producción de biomasa vegetal, disminuyéndola en altura, afectando por tanto a su calidad. La tabla 5.XXVIII demuestra, de nuevo en una versión muy

simplista, el efecto del contacto con el tóxico sobre la altura alcanzada por las semillas en su desarrollo. Tras el análisis en profundidad de este efecto, se comprueba que el comportamiento específico de las plantas presenta peculiaridades determinadas: mientras que la afectación de la cebada, el maíz y la lenteja se asocia con la interacción de la capacidad germinativa y de las diferentes concentraciones de metilmercurio, en el haba sólo es dependiente del segundo factor. Paralelamente, las habas, al contrario que las restantes plantas, tienden a reducir significativamente su desarrollo a partir de concentraciones altas (125 ppm), en tanto que en la lenteja la afectación es precoz, manifestándose significativamente a partir de la primera concentración (1.95 ppm).

Semillas (n°)	Altura (mm)	p
<i>H. vulgare</i> (465)		
Control (60)	54.1 ± 45.5	
[MeHg] (405)	34.4 ± 44.5	0.002
<i>V.faba</i> (220)		
Control (40)	134.4 ± 61.7	
[MeHg] (405)	68.5 ± 67.3	< 0.001
<i>L. culinaris</i> (1000)		
Control (100)	75.9 ± 29.6	
[MeHg] (1000)	18.2 ± 17.3	< 0.001
<i>Z. mays</i> (438)		
Control (60)	92.6 ± 35.6	
[MeHg] (378)	47.1 ± 41.9	< 0.001

Tabla 5.XXVIII: Visión global y simplista del desarrollo en altura de las semillas sanas e intoxicadas con MeHg (Test no pareado de Student)

La capacidad biométrica tóxica de las plantas germinadas expresada mediante la reducción de altura es significativa en todas ellas al correlacionarse inversamente con el grado de toxicidad del entorno y ajustarse excelentemente a regresiones curvilíneas cuadráticas ($r^2 > 0.90$), si bien disminuye nuevamente en la lenteja ($r^2 = 0.67$).

Por tanto, las cuatro plantas utilizadas se han comportado también, mediante el estudio de su desarrollo, como bioindicadoras y biomedidoras significativas de los riesgos tóxicos generados por la contaminación del metilmercurio y como estimadores útiles de la probabilidad de “calidad en desarrollo” de la biomasa a cosechar, en función del grado de contaminación mercurial de la huerta o pasto a explotar.

Del estudio conjunto desarrollado sobre las 1506 plantas que sugerirían un pequeño entorno medioambiental, se confirma el efecto tóxico mercurial que reduciendo considerablemente la altura de las plantas es altamente significativo ya en la primera concentración tóxica (Tabla 5.XXVI). La afectación de la altura se asocia con la interacción integrada por los factores concentraciones tóxicas y tipo de planta. Las diferencias de altura asociadas al segundo factor son explicables por existir diferencias naturales en el tamaño de las especies. Aún así, cabría un sesgo interpretativo en relación al factor tiempo de crecimiento dado que el estudio se diseñó previa determinación de un período limitado para la cosecha. A diferencia de los estudios realizados con test no paramétricos de conclusiones globales, tal sesgo queda minimizado al haberse realizado una metodología por análisis de varianza con comparaciones inter-grupo que estiman la altura media de la totalidad de las especies cultivadas como control.

Mediante la técnicas de regresión múltiple paso a paso, seleccionamos al maíz como mejor biomedidor del tóxico, con un coeficiente determinativo aún más elevado que el de las habas en el caso de la inhibición germinativa ($r^2 = 0.97$; $p < 0.001$).

Es de interés resaltar que complementando la utilidad de los cuatro tipos de plantas como bioindicadores ecotoxicológicos del presente estudio, el observador agronómico puede deducir unas repercusiones económicas muy relevantes consecuentes a la reducción tóxica de la biomasa en explotaciones dirigidas al aprovechamiento tanto animal como humano.

5.8. CONCLUSIONES

I.- CEBADA:

- La semilla de cebada es utilizable como bioindicadora de la contaminación por metilmercurio a través de la inhibición de la germinación. Todas las concentraciones tóxicas se comportaron como factores de riesgo ($OR > 1$) que desde la concentración 31.25 ppm tienden a incrementarse significativamente de forma exponencial, siendo letal la concentración 500 ppm. Estos riesgos de inhibición germinativa son estadísticamente predecibles con una fiabilidad del 85%.
- La planta de cebada tiene capacidad bioindicadora al influirse significativamente su desarrollo por la concentración de metilmercurio ($p < 0.001$). En el aspecto cuantitativo las diferencias con el control comienzan en la concentración 62.5 ppm ($p < 0.001$).
- La cebada posee capacidad biomedidora semi-cuantitativa de la concentración de metilmercurio, al correlacionarse significativamente las diferentes concentraciones con la tasa de no-germinación de forma directa y exponencial ($r^2 = 0.91$) y con el desarrollo en altura de la planta de forma inversa y cuadrática ($r^2 = 0.90$).

II.- MAIZ:

- La semilla del maíz es utilizable como bioindicadora de la contaminación por metilmercurio a través de la inhibición de la germinación. En este caso, los riesgos significativos comienzan en la concentración 62.5 ppm. Estos riesgos de inhibición germinativa son estadísticamente predecibles con una fiabilidad del 92%.
- La planta del maíz tiene capacidad bioindicadora al verse influido significativamente su desarrollo por la concentración de metilmercurio ($p < 0.001$). En el aspecto cuantitativo las diferencias con el control comienzan en la concentración 15.6 ppm ($p = 0.007$).
- El maíz posee capacidad biomedidora semi-cuantitativa de la concentración de metilmercurio, al correlacionarse significativamente las diferentes concentraciones con la tasa de no-germinación de forma directa y cuadrática ($r^2 = 0.93$) y con el desarrollo en altura de la planta de forma inversa y cuadrática ($r^2 = 0.97$).

III.- LENTEJA:

- La semilla de lenteja es utilizable como bioindicadora de la contaminación por metilmercurio a través de la inhibición de la germinación. Todas las concentraciones tóxicas se comportaron como factores de riesgo ($OR > 1$) que desde la concentración 31.25 ppm tienden a incrementarse significativamente de forma exponencial. Estos riesgos de inhibición germinativa son estadísticamente predecibles con una fiabilidad del 74%.
- La planta de lenteja tiene capacidad bioindicadora al influirse significativamente su desarrollo por la concentración de metilmercurio ($p < 0.001$). En el aspecto cuantitativo las diferencias con el control comienzan en la concentración 1.95 ppm ($p < 0.001$).
- La lenteja posee capacidad biomedidora semi-cuantitativa de la concentración de metilmercurio, al correlacionarse significativamente las diferentes concentraciones con la tasa de no-germinación de forma directa y cuadrática ($r^2 = 0.90$) y con el desarrollo en altura de la planta de forma inversa y exponencial ($r^2 = 0.67$).

IV.- HABA:

- La semilla del haba es utilizable como bioindicadora de la contaminación por metilmercurio a través de la inhibición de la germinación. Todas las concentraciones tóxicas se comportaron como factores irregulares de riesgo ($OR > 1$), excepto la concentración 3.90 ppm (OR indeterminado), que desde la concentración 125 ppm tienden a incrementarse significativamente de forma exponencial, siendo letal la concentración 500 ppm. Estos riesgos de inhibición germinativa son estadísticamente predecibles con una fiabilidad del 88%.
- La planta del haba tiene capacidad bioindicadora al influirse significativamente su desarrollo por la concentración de metilmercurio ($p < 0.001$). En el aspecto cuantitativo las diferencias con el control comienzan en la concentración 125 ppm ($p < 0.001$).
- El haba posee capacidad biomedidora semi-cuantitativa de la concentración de metilmercurio, al correlacionarse significativamente las diferentes concentraciones con la tasa de no-germinación de forma directa y cuadrática ($r^2 = 0.95$) y con el desarrollo en altura de la planta de forma inversa y exponencial ($r^2 = 0.91$).

V.- ANÁLISIS CONJUNTO MULTIVARIABLE:

Sobre el análisis de las 2123 semillas de las cuatro especies botánicas durante el tiempo experimental de cultivo se demuestra que:

- Las cuatro especies botánicas estudiadas se comportan experimentalmente como bioindicadores válidos de la toxicidad del metilmercurio a través de la inhibición de la germinación.
- El mejor bioindicador de la toxicidad mediante la inhibición germinativa es la cebada, al tener 8 veces más riesgo que el maíz (que es el bioindicador menos sensible al efecto tóxico) seguida por el haba (2.02 veces) y la lenteja (1.64 veces).
- Aunque todas las concentraciones, en contraste con los controles, se comportan como factores de riesgo con odds-ratio ajustados > 1 , la significación comienza en la concentración 7.81 ppm incrementándose exponencialmente hasta la concentración 500 donde el riesgo de germinación inhibida para cualquiera de los bioindicadores es 442.7 veces mayor.
- El impacto tóxico sobre la inhibición germinativa es estadísticamente predecible mediante el modelo logístico multivariable obtenido (área bajo la curva ROC = 0.89 ± 0.1).
- Las semillas de las cuatro especies botánicas se comportaron como biomedidores significativos del efecto tóxico al correlacionarse directamente el porcentaje de no-germinación con las concentraciones del tóxico, siendo la semilla de mayor potencial biométrico el haba ($r^2 = 0.96$; $p < 0.001$) en modelo cuadrático.

Sobre el análisis de las 1506 plantas de los cuatro especies botánicas durante el tiempo experimental de cultivo se demuestra que:

- El desarrollo de las semillas germinadas está influido por las diferentes concentraciones de MeHg, siendo significativas todas las diferencias con el control, tanto en cuanto a altura alcanzada por la planta como en cuanto al tipo de bioindicador experimentado, siendo por tanto bioindicadoras del MeHg.

- Las cuatro especies botánicas poseen capacidad biomedidora semicuantitativa al correlacionarse significativa e inversamente el desarrollo de las plantas con las concentraciones tóxicas, siendo la mayor capacidad el maíz ($r^2 = 0.97$; $p < 0.001$) en modelo cuadrático.

5.9. REFERENCIAS

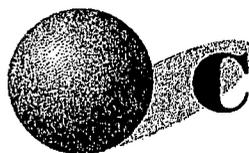
1. Alloway BJ. Soil processes and the behaviour of metals. In: Heavy Metals in Soils. B.J. Alloway (ed.), Blackie and Son, Ltd. 1990. Gran Bretaña.
2. Almeida WF; Pregnotatto W; Pigati P. Misuse of organomercury fungicides in Brazil. Bull World Health Organ 1976. 53 suppl: 133-8.
3. Al-Mufty Aw; Copplestone JF; Kazantzis G; Mahmoud RM; Majid MA. Epidemiology of organomercury poisoning in Iraq. Incidence in a defined area and relationship to the eating of contaminated bread. Bull World Health Organ 1976; 53 suppl: 23-26.
4. Al-Tikriti K; Al-Mufty AW. An outbreak of organomercury poisoning among Iraqi farmers. Bull World Health Organ 1976; 53 suppl: 15-21.
5. Barceló JF; Pomares GL. Metales. En: *Curso básico de Toxicología Ambiental*. L.A. Albert (ed.), 2ª ed., Editorial Limusa, S.A. 1990. México.
6. Bizily SP; Rugh CL; Meagher RB. Phytodetoxication of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. Nat Biotechnol 2000 feb; 18 (2): 213-7.
7. BOE N° 262 (1990): 32339-32340. Real Decreto 1310/1990, de 29 de Octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario.
8. Carlosena Zubieta, A. Estudio de métodos analíticos para la determinación de metales en suelos y vegetación. Influencia del tráfico rodado. Tesis Doctoral, 1995. Universidad de da Coruña.
9. Castroviejo S. Flora Ibérica. Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. VII. Leguminoseae. Real Jardín Botánico, CSIC. Ed. Castroviejo S. (et al.). Madrid: Real Jardín Botánico, 1999. 578 pp.
10. Czuba M. Methyl mercury toxicity in plant cultures: modification of resistance and demethylation by light and/or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Ecotoxicol Environ Saf 1987 Apr; 13 (2): 191-201.
11. Czuba M; Mortimer DC. Effects of heavy metals absorbed from water on the laser-induced fluorescence in *Elodea densa*. Ecotoxicol Environ Saf 1983 Oct; 7 (5): 447-50.
12. Czuba M; Seagull RW; Tran H; Cloutier L. Effects on methyl mercury on arrays of microtubules and macromolecular synthesis in *Daucus carota* cultures. Ecotoxicol Environ Saf. 1987 Aug, 14

(1): 64-72.

13. Czuba M; Komsta-Szumska E; Mortimer DC; Champagne C. Saline or plant-incorporated methylmercury effects on distribución, demethylation, and blood parameters in rats. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1987 Mar, 38 (3): 426-34.
14. Fergusson JE. Heavy elements in Plants. In: *The Heavy elements Chemistry, Environmental impact and Heavy effects*. Pergamon Press, 1990. Gran Bretaña.
15. Gómez I; Navarro-Pedreño J; Mataix. *Metales en los suelos*. En: *Metales en Sistemas Biológicos*. A. Mas, J.M. Azcue (eds.) Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A.. 1993. Barcelona.
16. Kabata-Pendias A; Kabata H. Trace elements in Soils and Plants. 2ª ed., CRC Press, 1992. Florida.
17. Maury-Brachet R; Ribeyre F; Boudou A. Actions and interactions of temperature and photoperiod on mercury accumulation by *Elodea densa* from sediment source. *Ecotoxicol Environ Saf* . 1990 Oct, 20 (2): 141-55.
18. McDonald P; Edwards RA and Greenhalgh JFD. (1986) *Nutrición Animal*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. Pág 432-7.
19. Nebreda AM; Sanz AM; Rodríguez FJ; Manrique A; Arrollo ML. *An. INIA/Ser. Forestal*. 1982, 5: 199-219.
20. Panda BB; Das BL; Lenda M. Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to biomonitor genotoxicity of low levels of mercury in aquatic environmental. *Mutat Res* 1988 Oct, 206 (2): 275-9.
21. Patra J; Baisakhi B; Mohapatro MK.; Panda BB. Aluminium triggers genotoxic adaptation to methyl mercuric chloride and ethyl methane sulfonate, but not to maleic hydrazide in plant cells in vivo. *Mutat Res* 2000 Feb 16; 465 (1-2): 1-9.
22. Polhill O; Raven PH. *Advances in Legume Systematics*. Part 1, 1981.
23. Polunin O. In: *Guía de campo de las flores de Europa*. Ed. Omega, Barcelona, 1965b. 1974. 1803 pp.
24. Polunin O; Smithies BE In: *Guía de Campo de las flores de España, Portugal y Sudoeste de Francia*. Ed. Omega S.A., Barcelona, 1977.
25. Raven PH; Evert RF; Eichhorn SE. *Biología de las plantas*. Reverté, Barcelona. 1991-1992.
26. Ribeyre F; Boudou A. Experimental study of inorganic methylmercury bioaccumulation by four species of freshwater rooted macrophytes from water and sediment. *Ecotoxicol Environ Saf*

1994 Aug; 28 (3): 270-86.

27. Rivera Nuñez D; Obón de Castro C. Guía de INCAFO de las plantas útiles y venenosas de la Península Ibérica y Baleares (Excluidas medicinales). 1991.
28. Rogriguez FJ; Manrique A; Carbonel G; Nebreda AM. An INIA/Ser. Recursos Naturales, 1980, 4:11-32.
29. Shacklette HT; Erdman JA; Harms TF; Papp CSE. Trace elements in plant foodstuffs. In: Toxicity of Heavy Metals in the Environment. Part 1. FW Oehme (ed.), Marcel Dekker, Inc. 1978, Nueva York.
30. Smith JC; Farris FF; Burg R. Chemical type of mercury in patients in the outbreak of organomercury poisoning in Iraq. Bull World Health Organ 1976; 53 suppl: 61-63.
31. Subhadra AV; Panda BB. Metal-induced genotoxic adaptation in barley (*Hordeum vulgare*) to maleic hydrazide and methyl mercuric chloride *Mutat Res* 1994 Apr, 321 (1-2): 93-102.
32. Stern KR. Introductory plant biology. McGraw-Hill, Boston. 8ª ed., 2000; 589 p.
33. Tiffin IO. The form and distribution of metals in plants. An Overview. In: Biological implications of metals in the Environment. Proceeding of the Fifteenth Annual Hanford Life Sciences Symposium at Ritchland, Washington, 1975. Technical Information Center Energy Research and Development Administration. EEUU.
34. Truhaut R; Ferrando R. [Toxicity by relay. I. General principles of a new method for the assessment of Toxicity of additives to animal feeds]. *Toxicology*. 1975; 3 (3): 361-8.
35. Ward NI; Savage JM. *Sci Total Environ*. 1994, 146/147: 309-319.



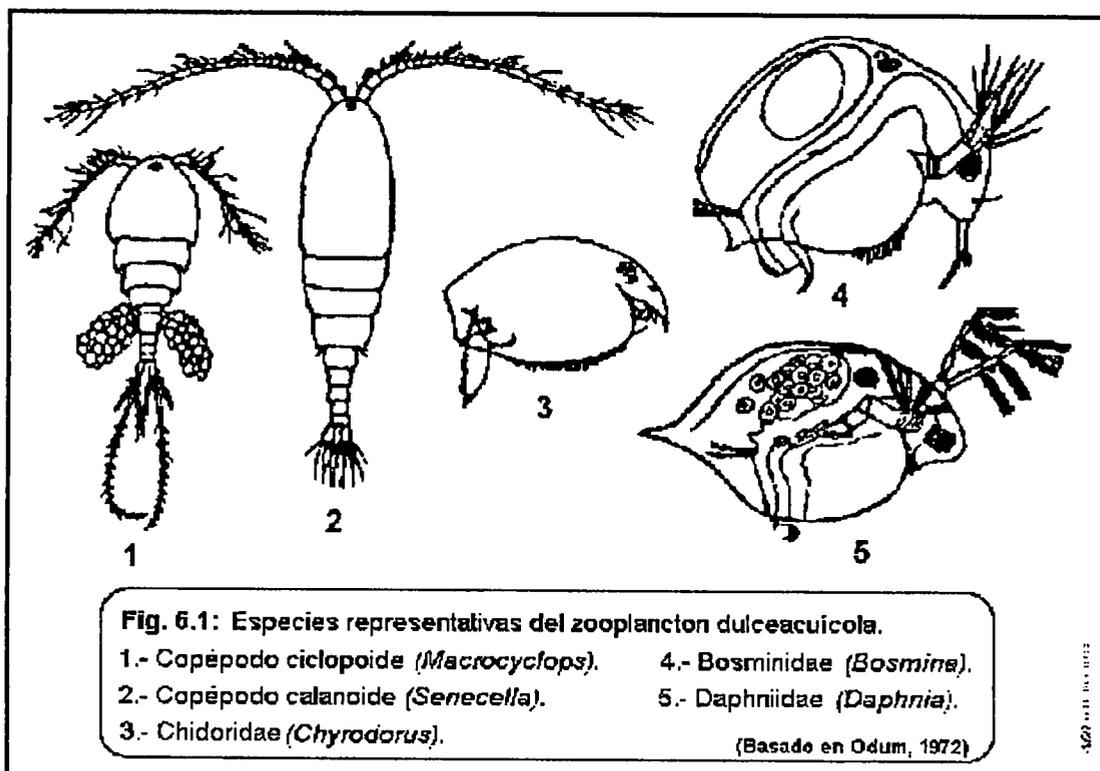
CAPÍTULO 6

6. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL I:

ARTRÓPODOS ACUÁTICOS: ZOOPLANCTON

El zooplancton es la fracción animal del plancton o conjunto de formas vivas que se encuentran en suspensión en las zonas iluminadas de las masas de agua (Barrientos, 1988). Está formado por ejemplares de pequeño tamaño, básicamente crustáceos y formas larvianas de organismos mayores.

Dentro de los grupos importantes del zooplancton, se van a utilizar las especies grandes de cladóceros como algunas especies de *Daphnia* (Daphniidae), *Bosmina* (Bosminidae) y *Chydorus* (Chydoridae) y algunos copépodos de la familia Cyclopoidea (*Cyclops*) (Fig. 6.1).



6.1. BRANQUIÓPODOS

Los branquiópodos son formas primitivas de crustáceos caracterizados porque presentan un tronco con un número de segmentos diferente según el grupo y unos apéndices aplanados y foliáceos que les permite tener una buena movilidad en el agua. Son especies principalmente de agua dulce, entre ellas, el representante más común es la *Daphnia* (pulga de agua), también existen algunos géneros que viven en aguas salobres como la *Artemia salina* (Bellan-Santini, 1979).

Agrupación cuatro órdenes vivientes en tres subclases:

- Subclase *Sarcostraca* (Tasch, 1969)
 - Orden *Anostraca* (Sars, 1867)
- Subclase *Calmanostraca* (Tasch, 1969)
 - Orden *Notostraca* (Sars, 1867)
- Subclase *Diplostraca* (Gerstaecker, 1866)
 - Orden *Conchostraca* (Sars, 1867)
 - Orden *Cladocera* (Latreille, 1829)

6.1.1. Orden *Cladocera* (Latreille, 1829)

Son formas dulceacuícolas y marinas de pequeñas dimensiones, no superan los 20 mm. Se conocen unas 600 especies, en 11 familias, de las que más del 90% son dulceacuícolas. En ellos se distingue claramente la cabeza del cuerpo, el cual se halla cubierto por un caparazón. Los órganos sensibles a la luz consisten en un gran ojo compuesto y pequeños ocelos. El segundo par de antenas es un gran apéndice nadador y constituye el órgano principal de locomoción. La boca consta de unas mandíbulas grandes y quitinizadas, para triturar el alimento, un par de pequeñas maxilas que son utilizadas para empujar el alimento a través de las mandíbulas y un labro medio que cubre las otras piezas bucales (Wetzel, 1981).

Los fenómenos de ciclomorfosis o alotropías estivales, son frecuentes como resultado de variaciones en factores ambientales, como temperatura, alimentación, etc. En ellos, se modifican los rangos de crecimiento entre las distintas partes del cuerpo.

6.1.1.1. Morfología externa

El cuerpo se encuentra dividido en tres tagmas: céfalon, pereion y pleon (los últimos no limitados claramente) (Barrientos,1988). En general, está cubierto por un caparazón que lo rodea lateralmente, pero no es de tipo bivalvo, pues no presenta zona media de articulación. Este caparazón nunca cubre la cabeza y se suelda a dos o más somitos del tronco (Fig. 6.2). En algunos casos, está reducido a una pequeña cámara incubadora o ephippium.

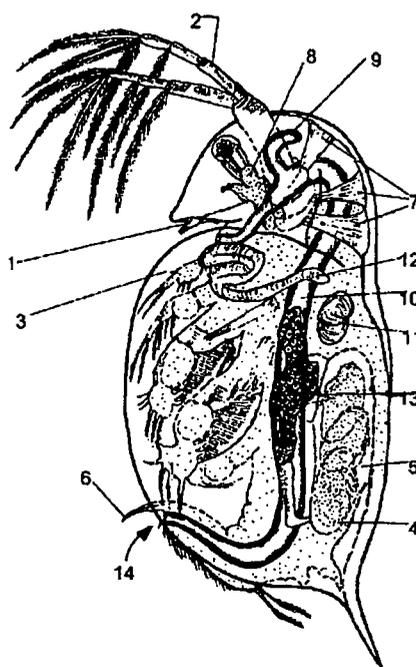


Fig. 6.2: Anatomía de Cladócero: 1: Anténulas. 2: Antenas. 3: Periópodos. 4: Individuos en desarrollo. 5: Cámara incubadora. 6: Cerco. 7: Músculos. 8: Cerebro. 9: Ciego gástrico. 10: Mesodeo. 11: Corazón. 12: Glándula maxilar. 13: Ovario. 14: Ano (de la Fuente, 1994)

La cabeza es libre, en general prolongada en un corto rostro. Tienen un ojo compuesto sésil, resultado de la fusión de dos, situado en la línea media, y en el interior de una cavidad sin comunicación con el exterior. Este puede moverse por la acción de músculos. También existe un ocelo nauplius, frecuentemente sin pigmento y, a veces, un órgano nual, dorsal o poros cefálicos. La función de estos sería colaborar a la osmorregulación, en algunos casos para fijación y en otros se desconoce su función.

Las anténulas son unirrámeas, cortas, pudiendo estar modificadas en el macho. Las antenas con función natatoria, birrámeas más o menos largas y con setas.

Las mandíbulas sin palpo. Maxílulas y maxilas reducidas, las últimas a veces

ausentes.

El tronco corto con cuatro a seis pares de apéndices foliáceos, a veces modificados. El primer par, en el macho, puede ser ganchudo y se emplea para sujetar a la hembra. Un corto postabdomen sin apéndices, curvado hacia delante, provisto dorsalmente de procesos para sujeción y distalmente de hileras de espinas. Termina en un par de ramas caudales espiniformes.

Los gonoporos se localizan en el postabdomen. En el macho abren cerca del ano, por lo que dicho postabdomen puede actuar como órgano copulador. En la hembra abren en una cavidad incubadora dorsal, bajo el caparazón, en donde se desarrollan los huevos (de la Fuente, 1994).

6.1.1.2. Morfología interna

El sistema nervioso muestra un grado de condensación variable, de modo que, en algunas formas, los ganglios de la cadena nerviosa se pueden fusionar en una única masa post-oral. El sistema digestivo es tubular simple, a veces con un par de pequeños divertículos. El corazón es pequeño, globuloso y con un par de ostiolas. En el adulto existe una glándula maxilar con función excretora.

Los sexos son separados con una o dos gónadas. En los machos puede existir un único gonoporo que, a veces, se continúa en un pene. La partenogénesis es frecuente. Tienen huevos de resistencia (de la Fuente, 1994).

6.1.1.3. Desarrollo

Los cladóceros, muestran un contraste interesante en los ciclos vitales y en la reproducción con respecto a los copépodos. Los cladóceros se reproducen partenogenéticamente, no así en los copépodos. Los huevos son depositados en una cámara incubatriz que es una cavidad de la parte dorsal del cuerpo cubierta por las valvas del caparazón que envuelve el cuerpo de la hembra. Los huevos se desarrollan en esta "cámara de cría" (Fig. 6.2a) y eclosionan en forma de pequeños individuos parecidos a sus progenitores. El desarrollo es directo, sin formas larvarias de vida libre, salvo en *Leptodora*, en donde del huevo sale una larva metanauplius. Los machos aparecen solamente a intervalos raros, por lo regular a principios de condiciones desfavorables. Los huevos fecundados se desarrollan en efipios o "huevos invernales" (Fig. 6.2b), que tienen una cáscara resistente y están en condiciones de sobrevivir en estanque seco (Odum, 1972).



Fig. 2a: Daphnia con huevos de verano

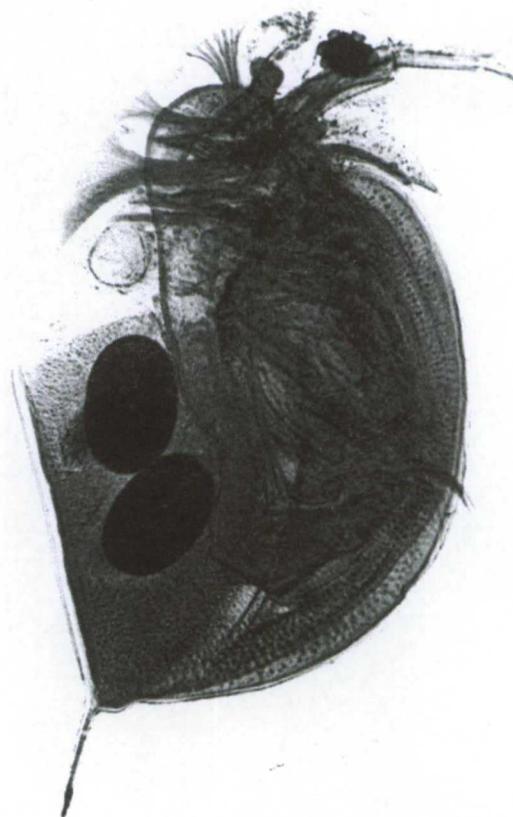


Fig. 6.2b: Daphnia con huevos de invierno

(Freeman & Bracegirdle, 1982)

Presenta dos subórdenes:

Eucladocera (Eriksson, 1932): Tienen un caparazón generalmente bien desarrollado; al menos dos pares de pereiópodos filopodiales y un ojo naupliar (salvo los *Polyphemidae*). La alimentación es micrófaga. No existen fases larvarias. A este grupo pertenecen los géneros *Daphnia*, *Bosmina* y *Chydorus*.

Haplopoda (Sars, 1865): El caparazón está reducido a una cámara incubadora. Los pereiópodos son estenopodiales. No presentan ojo naupliar. La alimentación es macrófaga. El desarrollo embrionario pasa por una fase metanauplio. A este grupo pertenece el género *Leptodora* (Nieto y Mier, 1985).

6.1.1.4. *Daphnia*

Clase Branchiopoda (Latreille, 1817)

Subclase Diplostraca (Gerstacker, 1866)

Orden Cladocera (Latreille, 1829)

Suborden Eucladocera (Eriksson, 1932)

Superfamilia Daphnioidea

Familia Daphniidae



Fig. 6.3: Daphnias



Fig. 6.4: Daphnia

En las especies de esta familia el caparazón está bien desarrollado. Son las auténticas “pulgas de agua” (Figs. 6.3 y 6.4). La locomoción “rápida” la ejercen con las antenas. Se desplazan a saltos dirigidos hacia arriba por acción de un batido brusco de las antenas. Tienen cinco pares de pereiópodos. Los pereiópodos 2 a 5 provocan unas

corrientes de agua semejantes a las que provocan los anostráceos, pero la filtración la realizan solamente con los pereiópodos 3 y 4. Las hembras *Daphniidae* mudan poco después de la puesta y los huevos quedan encerrados en la exuvia (Fig. 6.5) de la parte dorsal del caparazón,



Fig. 6.5: efpipio

estructura que recibe el nombre de efpipio, que contribuye a asegurar la perduración de los huevos resistentes frente a la acción de las circunstancias adversas (Nieto y Mier, 1985).

Las anténulas son muy cortas en la hembra y se insertan en la parte posterior

del cefalón, muy cerca del labro. El labro carece de quilla. El ano está en posición terminal. (Barrientos, 1988).

6.1.1.5. *Bosmina*

Clase Branchiopoda (Latreille, 1817)

Subclase Diplostraca (Gerstaecker, 1866)

Orden Cladocera (Latreille, 1829)

Suborden Eucladocera (Eriksson, 1932)

Superfamilia Daphnioidea

Familia Bosminidae

Es un organismo sistemáticamente muy próximo a *Daphnia* (Figs. 6.6 y 6.7). La hembra posee unas anténulas con las sedas olfatorias en posición medial, adosadas al rostro y acabadas en una punta larga y adelgazada distalmente. Tiene seis pares de pereiópodos. El labro no tiene quilla. El ano está situado en posición terminal (Barrientos, 1988).





6.1.1.6. *Chydorus*

Clase Branchiopoda (Latreille, 1817)

Subclase Diplostraca (Gerstaecker, 1866)

Orden Cladocera (Latreille, 1829)

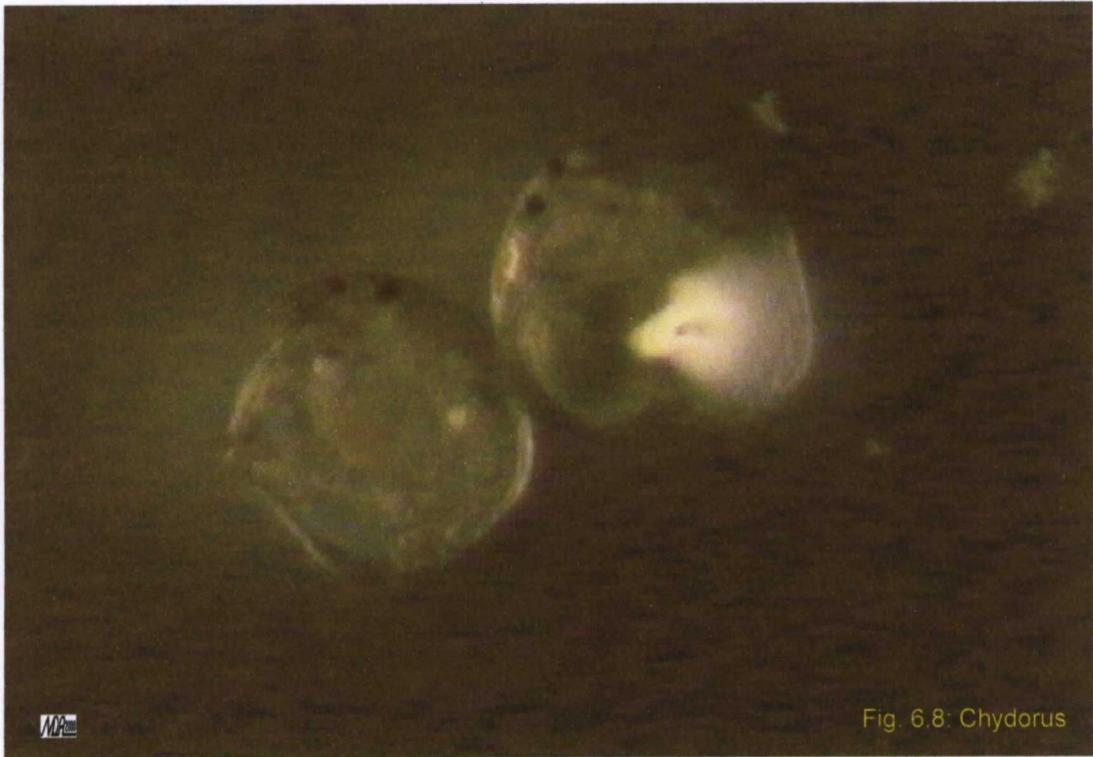
Suborden Eucladocera (Eriksson, 1932)

Superfamilia Daphnioidea

Familia Chydoridae

La cabeza posee un rostro que se prolonga en una especie de pico que se proyecta ventralmente. El labro con una quilla como adaptación a sus hábitos bentónicos.

Tiene cinco pares de pereiópodos y anténulas reducidas, similares a las de *Daphnia*. El ano está en posición medial (Barrientos, 1988) (Figs. 6.8 y 6.9)



6.2. COPÉPODOS

Los copépodos de vida libre de este orden de la clase crustáceos pueden ordenarse en tres grupos distintos: los subórdenes calanoides, ciclópidos y harpacticoides. Aunque su identificación precisa se basa en detalles morfológicos de los apéndices, existen algunas características generales que definen los grandes grupos. El cuerpo consiste en un metasoma anterior (cefalotórax), dividido en dos regiones, la de la cabeza, que lleva cinco pares de apéndices, entre antenas y apéndices bucales, y la del tórax, con seis pares de patas, principalmente nadadoras. La parte posterior o urosoma está formada por los segmentos abdominales, el primero de los cuáles en las hembras se encuentra modificado en un segmento genital; el segundo, terminal, está ramificado y provisto de sedas, en ambos sexos.

Los tres subórdenes de copépodos de vida libre se distinguen por la estructura del primer par de antenas, por el urosoma y por el quinto par de patas (fig. 6.10). Los

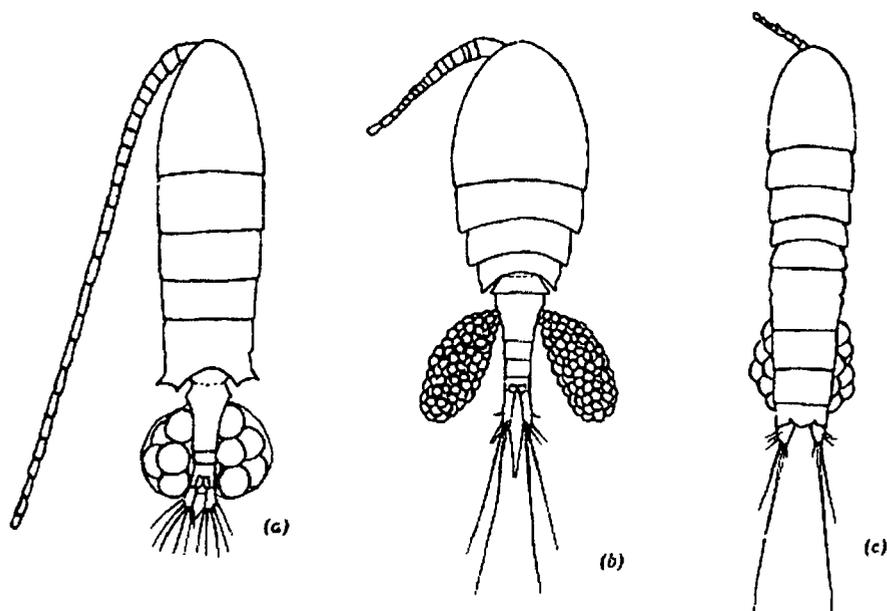


Fig. 6.10: Esquema de los tres tipos de copépodos hembras dulceacuícolas: a) Calanoide; b) Ciclópido; c) Harpacticoides (de Wilson & Yeatman, 1959)

copépodos harpacticoides son casi exclusivamente litorales, habitando entre la macrovegetación, particularmente entre musgos, sedimentos litorales y materia orgánica

particulada. Aunque los copépodos ciclópodos agrupan principalmente especies bentónicas litorales, algunas de ellas son predominantemente planctónicas y forman importantes componentes de la fracción del zooplancton formado por copépodos, especialmente en pequeños lagos someros. Los copépodos calanoides viven casi exclusivamente como planctónicos en la zona pelágica (Wetzel, 1981).

6.2.1. Descripción

Los copépodos son crustáceos que pertenecen a la Clase Copepoda (Milne Edwards, 1840). Los de vida libre son formas de pequeño tamaño, entre 0.2 y 20 mm y los parásitos pueden alcanzar hasta 32 mm. Hay aproximadamente unas 10.000 especies adaptadas a una gran diversidad de hábitats y modos de vida. Hay especies marinas, dulceacuícolas, planctónicas, bentónicas, de vida libre, comensales, parásitas, etc.. Son extremadamente relevantes en el plancton y su situación en la cadena trófica es importantísima (de la Fuente, 1984).

Los fenómenos de ciclomorfosis o polimorfismo estacional es poco característico de los copépodos adultos, si lo comparamos con el establecido en los partenogénéticos cladóceros. El rasgo más aparente es la existencia de una relación inversa entre el tamaño y el aumento de temperatura, es decir, los individuos de las poblaciones estivales tienden a ser algo menores que los de las estaciones frías (Wetzel, 1981).

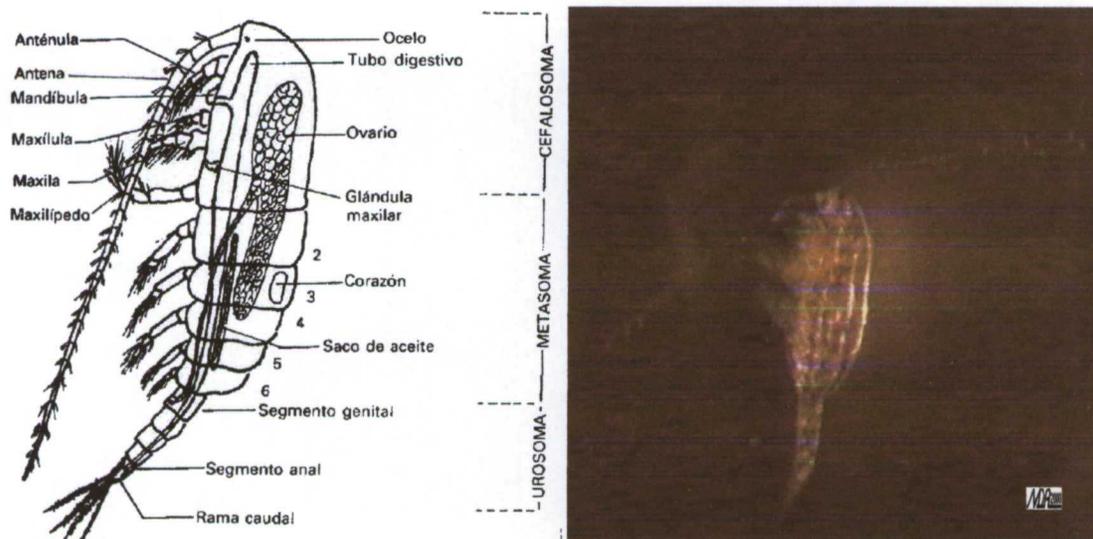


Fig. 6.11: Anatomía de copépodo (de la Fuente, 1994) y Copépodo

Las especies de vida libre presentan una cabeza, un tórax con seis segmentos y un abdomen de cinco, organizados en un cefalosoma, un metasoma y un urosoma, o un prosoma (cefalosoma + metasoma) y un urosoma (Fig. 6.11).

El cefalosoma incluye los segmentos cefálicos y el primero del tórax y puede prolongarse anteriormente por un corto rostro. En él se encuentra un ojo nauplius. El metasoma incluye el resto de los segmentos torácicos hasta una zona de articulación, que en ocasiones puede faltar.

Las anténulas son unirrámeas y largas en las formas nadadoras como en los calanoideos, o algo reducidas, como en los harpacticóideos. Pueden presentar dimorfismo sexual en relación con la sujeción de la hembra. Tiene un gran interés en estudios sobre filogenia. Las segundas antenas son de desarrollo variable, pueden ser uni o birrámeas, a veces están reducidas y en ocasiones ausentes. Las mandíbulas en general son birrámeas. Las maxilulas espinosas o setosas, en general birrámeas. Las maxilas suelen ser unirrámeas, a veces prensiles. Los maxilípedos, en número de uno o dos pares, son unirrámeos y con morfología semejante a la de las maxilas aunque más desarrollados. Los demás toracópodos son, en general, birrámeos; los de un mismo segmento suelen estar unidos entre sí por una estructura denominada "cópula, retináculo o esclerito intercoxal", que permite un movimiento sincrónico durante la natación. A veces están modificados o reducidos; por ejemplo, el último par en machos de calanoideos se encuentra frecuentemente modificado como órgano copulador, mientras que en la hembra está reducido o falta.

El abdomen es estrecho y cilíndrico, sin apéndices. El número de segmentos visibles varía, pues los primeros suelen estar fusionados, de modo que oscila de cinco a dos. En el primero, o "somito genital" (el séptimo torácico según otros), abren los gonoporos. El último es el anal y lleva un par de ramas caudales unisegmentadas, con setas, a veces muy desarrolladas para flotación.

6.2.2. Morfología interna

El sistema nervioso está bastante condensado. Tras el anillo periesofágico, que emite nervios a los apéndices y estructuras del cefalosoma, se encuentra una corta cadena nerviosa simple sin ganglios visibles y que, muy rara vez, sobrepasa el cuarto o quinto segmento del metasoma.

Como órganos sensoriales, además de setas localizadas sobre todo en las

anténulas, se encuentra un ocelo u ojo nauplius algo complejo (con células lenticulares, sensoriales, tapetales y pigmentarias). No hay órgano frontal, pero existe un órgano, denominado Gicklhorn, posiblemente fotorreceptor asociado a axones neurosecretores.

El sistema digestivo es muy simple. El intestino medio suele presentar pequeños ciegos pares, a veces lobulados, y un ciego mediano anterior. El intestino posterior, al igual que el anterior, posee músculos circulares dilatadores que permiten la entrada y salida de agua .

Existen glándulas en el labro y en el epistoma.

En la cavidad visceral y situado junto al digestivo se puede encontrar un "saco de aceite" que suele servir de reserva alimenticia, aunque en otros casos, como en los calánidos, puede colaborar en la flotación.

El sistema circulatorio está reducido. En algunos grupos existe un pequeño corazón, con un par de ostiolas y una corta aorta, pero falta en la mayoría. En otros, se reconocen algunos vasos pero no hay corazón. En estos casos, la hemolinfa circula con la ayuda de las contracciones musculares peristálticas del digestivo (sobre todo en formas parásitas) y de la capa muscular corporal.

La excreción en el adulto se realiza gracias a glándulas maxilares. Sin embargo, en la larva nauplius se reconoce una glándula antenal. El epitelio del intestino medio interviene también en la excreción.

Existen glándulas unicelulares en la epidermis que, además de la lubricación, colaboran en la eliminación de desechos. Estas glándulas también son muy importantes en la formación de las envueltas que protegen a los copépodos harpacticoides de aguas dulces contra la desecación en charcas temporales.

Poseen sexos separados, aunque ocasionalmente se da la partenogénesis en algunos harpacticoides.

Los machos de especies de vida libre suelen presentar un sólo testículo y uno o dos espermiductos, cuya parte terminal es glandular e interviene en la formación del espermatóforo. A la altura del segmento genital el espermiducto se ensancha para formar una vesícula seminal. En la hembra hay uno o dos ovarios. Los gonoductos femeninos terminan en un atrio genital en el que desembocan glándulas. En muchas hembras, además de la abertura genital principal, existen orificios laterales que comunican con

espermatecas, simples o dobles. Hay glándulas productoras de sustancias cementantes que permiten aglutinar a los huevos en masa u ovisacos, que se sitúan en el primer segmento abdominal o segmento genital.

6.2.3. Desarrollo

Los copépodos son bisexuales y la cópula se efectúa mediante un breve abrazo por el que el macho transfiere los espermatozoides a la cara ventral del segmento genital de la hembra. La fertilización de los huevos puede tener lugar inmediatamente después o al cabo de algunos meses. Los huevos fertilizados son transportados por las hembras en uno o dos sacos ovígeros (Wetzel, 1981). La hembra es capaz de almacenar espermatozoides en una copulación para que dure para varias puestas de huevos. De esta forma, los copépodos están en condiciones de competir en materia de aumento rápido con otros organismos del plancton, que tienen partenogénesis o reproducción asexual (Odum, 1972). Los huevos eclosionan y se liberan en fase de larva nauplius, salvo en algunas formas parásitas que lo hacen en una fase más tardía de copepodito I. La secuencia del desarrollo conlleva varios estados de nauplius y de copepodito (cinco) antes de dar lugar al adulto. El estado de copepodito se reconoce, entre otras cosas, por el comienzo de la diferenciación del sistema gonadal, la aparición de la glándula maxilar y el desarrollo de las ramas caudales (de la Fuente, 1994).

6.2.4. Consideraciones generales sobre la flotación y los movimientos

La mayor parte de los copépodos forman parte del plancton por lo que presentan cierto número de adaptaciones orientadas hacia la flotación. Esto se logra incrementando la relación superficie/peso, mediante el desarrollo de setas y apéndices que el animal extiende cuando desea mantenerse en un estrato y recoge cuando desea desplazarse mediante movimientos natatorios. También se potencia mediante dispositivos que aligeran el peso, por ejemplo gotas de aceite. Utiliza movimientos verticales para el desplazamiento. Los factores determinantes de este desplazamiento son la luz, la temperatura y la presión.

Consiguen la progresión lenta mediante la acción de los endopodios de las anténulas.

Algunos copépodos como los Cyclops utilizan sus apéndices cefálicos, antenas, maxilípedos, etc. para capturar presas que hallan removiendo el limo del fondo.

Entre los copépodos libres, los calanoides son fundamentalmente planctónicos, mientras que los harpacticoides son bentónicos, y entre los ciclopoideos existen especies de los dos tipos.

Usualmente se admiten siete órdenes de copépodos: *Calanoida* (Sars, 1903), *Harpacticoida* (Sars, 1903), *Cyclopoida* (Burmeister, 1834), *Monstrilloida* (Sars, 1903), *Caligoida* (Sars, 1903), *Lernaeopodoida* (Wilson, 1910) y *Notodelphyoida* (Sars, 1921).

6.2.5. Orden Cyclopoida (Burmeister, 1834) (Cyclops)

Clase Copepoda (Mine Edwards, 1840)

Orden Cyclopoida (Burmeister, 1834)

Familia Cyclopinidae

Género Cyclopina

Pueden ser de vida libre, planctónicas o bentónicas, comensales o ectoparásitas. Muchas son dulceacuícolas. Tienen anténulas cortas de 10-16 artejos y antenas unirrámeas. Las mandíbulas con gnatobases. Los sextos toracópodos con un endopodito reducido. Articulación corporal, en general presente, localizada entre el quinto y sexto segmento torácico. Sin corazón (de la Fuente, 1994) (Figs. 6.12 y 6.13).



Fig. 6.12: Copépodo ciclopoide con sacos ovígeros

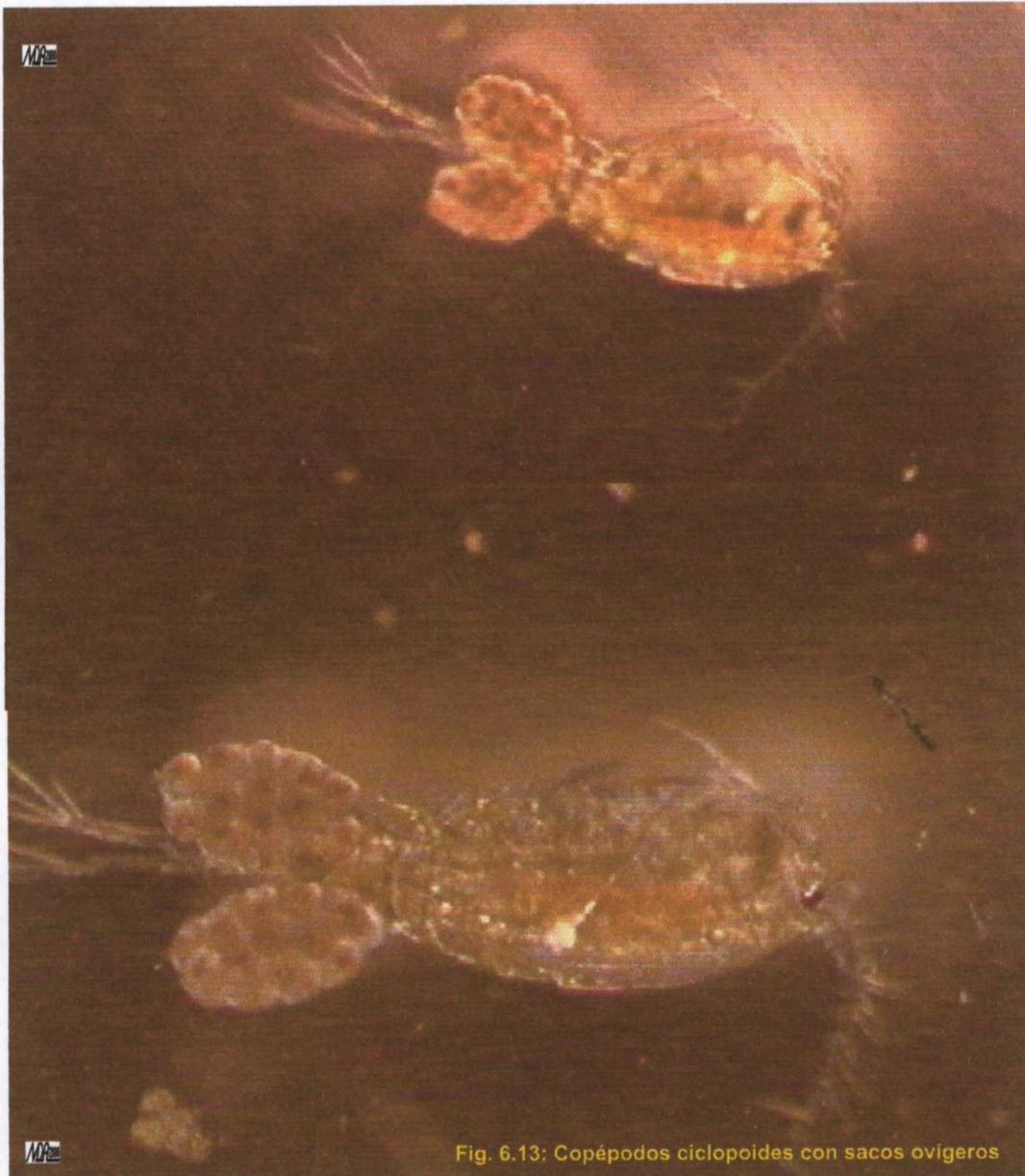


Fig. 6.13: Copépodos ciclopoideos con sacos ovigeros

6.2.6. Orden Calanoida (Sars, 1903)

Son animales de vida libre, la mayoría de ellos planctónicos. Las anténulas son usualmente más largas que el cuerpo con 16-26 artejos, geniculadas en el macho. La cavidad bucal es abierta y con antenas, anténulas y maxílulas birrámeas. Mandíbulas con gnatobases y segundas maxilas y maxilípedos unirrámeos. Patas torácicas birrámeas y

multiarticuladas, con setas para nadar. El último par (el sexto) unirrámeas, que puede modificarse como órgano copulador en el macho, o perderse. Existe una línea de articulación entre el último segmento torácico y el primero abdominal. En las hembras el abdomen está formado por 3-4 segmentos (de la Fuente, 1994). Son los únicos copépodos con corazón y un sólo conducto deferente. Los bordes del cuerpo son subparalelos y hay un adelgazamiento progresivo hacia el extremo caudal (Nieto & Mier, 1985) (Figs. 6.14, 6.15 y 6.15a).



Fig. 6.14: Copépedo calanoide



Fig. 6.15: Copépedo calanoide con sacos ovígeros



6.3. MIGRACIÓN VERTICAL Y DISTRIBUCIÓN ESPACIAL EN CLADÓCEROS Y COPÉPODOS

Uno de los caracteres más notables de los cladóceros zooplanctónicos y, en menor grado, de los copépodos, es su marcada migración vertical diaria a lo largo de grandes distancias. No hace falta decir que la luz es el principal estímulo para la migración vertical (Siebeck, 1960; Ringelberg, 1964). Estos movimientos varían considerablemente según las condiciones del agua en cuanto a características lumínicas bajo el agua, la estación, la edad y el sexo de las especies.

Existen respuestas claras ante los cambios de luz, pero no se ha probado que los organismos planctónicos tengan tendencia a permanecer en el mismo ambiente de luz.

La intensidad de luz es siempre la que marca la pauta. Las respuestas ante cambios de luz pueden demostrarse tanto experimentalmente como en condiciones anormales de luz natural, como por ejemplo, en condiciones de semioscuridad durante un eclipse solar (Brighth et al., 1972).

Existen muchas variaciones en las migraciones verticales. Se ha observado que tanto en cladóceros como en copépodos los movimientos de migración de los individuos jóvenes, en general, son de mayor amplitud que los de los adultos. Además, existen diferencias entre los modelos migratorios de machos y hembras, especialmente en los copépodos. La amplitud y la tasa de migración también varían considerablemente de manera estacional en las épocas de ausencia de hielo. Algunos de estos cambios pueden estar relacionados con la disminución progresiva del contenido de oxígeno en los niveles inferiores, así como con los cambios de las condiciones de luz y de turbidez planctónica. Aunque la temperatura interfiere en algún grado en las tasas de locomoción, en el metabolismo y en la regeneración de pigmentos visuales fotoquímicos, su efecto sobre las migraciones verticales es pequeño en comparación con el efecto de la luz.

El zooplancton se encuentra preferentemente en las zonas de afloramiento de nutrientes (George y Edwards, 1973) y las máximas concentraciones en la superficie de *Daphnia* en sus migraciones verticales es a primeras horas de la mañana y de la tarde.

6. 4. OBJETIVOS

6.5. MATERIAL Y MÉTODOS

6.4. OBJETIVOS

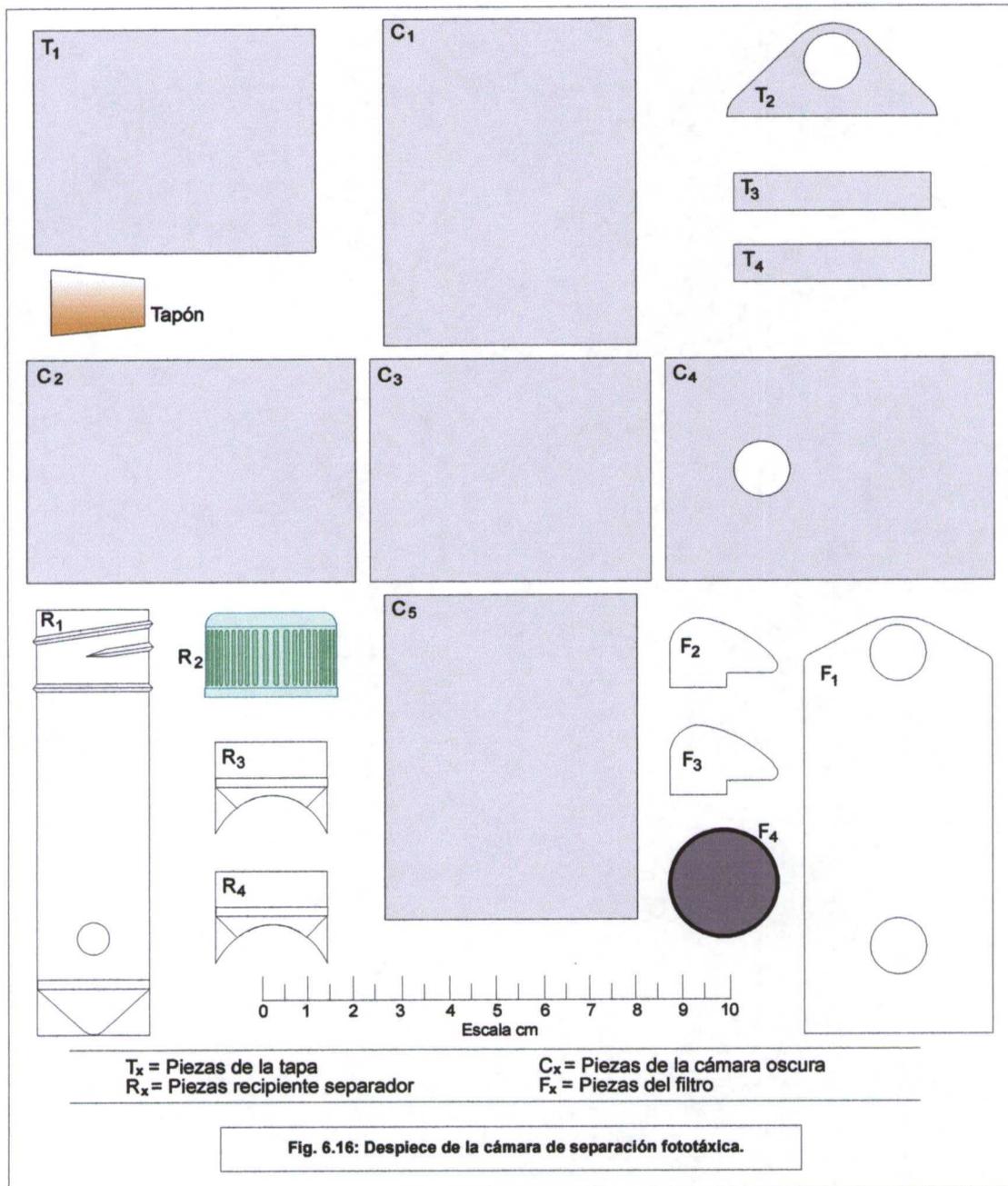
- Estudiar si el zooplancton puede actuar como posible bioindicador de los daños producidos por metales pesados (MeHg) mediante el estudio de la fototaxia y el porcentaje de mortalidad.
- Determinar, en caso positivo, su capacidad como ecobiomedidor.

6.5. MATERIAL Y MÉTODOS

6.5.1. Material

- Acuarios de 32 L
- Cámaras de separación fototóxica
- Embudos de vidrio de distintos diámetros
- Etiquetas
- Frascos de 200 ml
- Frascos de 2 L
- Filtros de papel
- Filtro textil para cámara fototóxica
- Fijador
- Gradillas
- Lámpara halógena BT
- Lupa Askania SMT 4
- Pipetas de separación con pera
- Redes de plancton
- Rejillas PCX para recuento de zooplancton
- Tubos de 5 ml para guardar zooplancton
- Tubo sifón flexible

Para el experimento se diseñó un prototipo original de **cámara de separación fototóxica** que se esquematiza en plano en las figs. 6.16 y 6.17, y en aspecto general las figs. 6.18 y 6.19. Consiste en una cámara oscura cuyas paredes y tapa se han fabricado de metacrilato negro, con un orificio en la parte inferior de la pared delantera, a través del cual se proyecta un foco lumínico. Este orificio da paso a una zona transparente a donde emigran los artrópodos atraídos por la luz. Consta, además, de una pieza de metacrilato transparente con un filtro textil que se coloca en la cámara, previo al depósito de la muestra, permeable a los líquidos pero no al zooplancton, para evitar su paso a la zona transparente. Estabilizada la muestra, se procede a la retirada del filtro y colocación de la tapa para conseguir una total oscuridad. A continuación se proyecta un foco de luz para permitir el paso de artrópodos con fototaxia positiva.



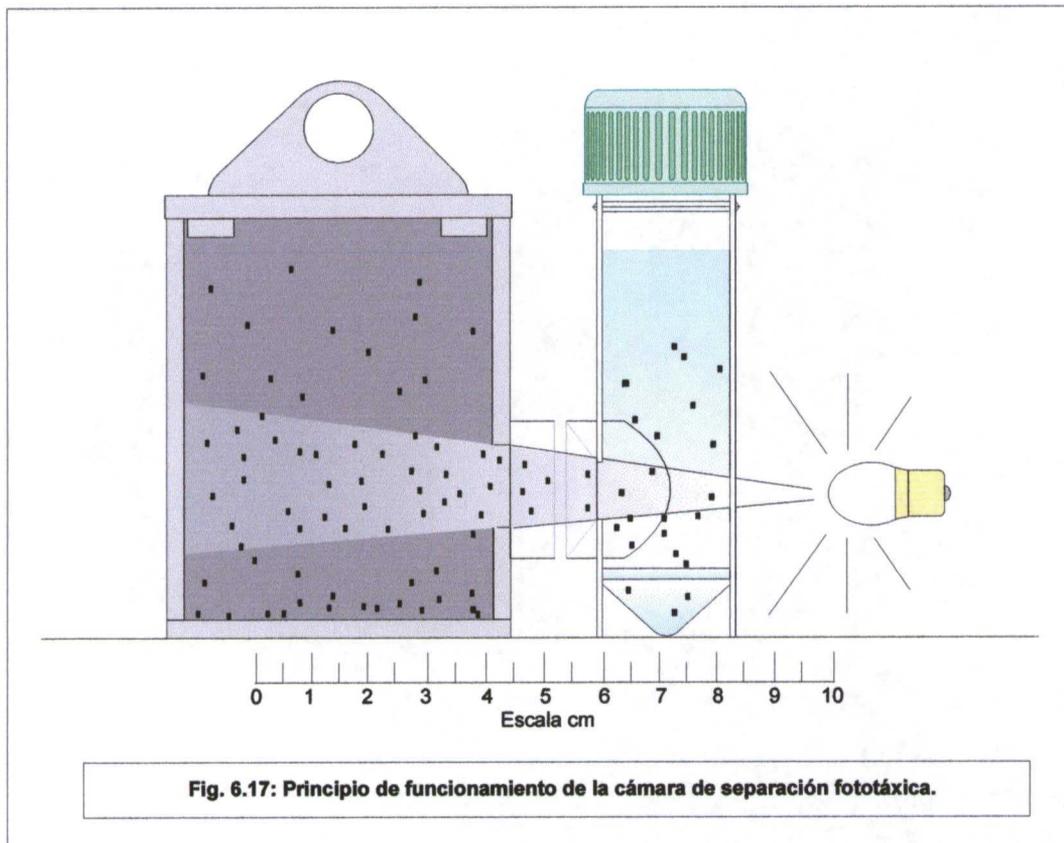


Fig. 6.19: Cámara de separación fototáctica



6.5.2. Metodología

El trabajo de campo se realizó en el pantano de Valmayor (Madrid), procediendo a la recogida mediante redes de plancton pequeñas, de nylon y de malla muy fina y tomando muestras entre 20 a 30 cm de profundidad y superficiales. El muestreo se ha realizado de día lo que representa un factor importante teniendo en cuenta que, por los fenómenos de fototropismo que presentan las especies de este grupo, los resultados del muestreo pueden ser muy distintos dependiendo de si se efectúa de día o de noche.

El zooplancton se depositaba en frascos de cristal con una capacidad para 2 litros en los que previamente se introducen 1.800 ml de agua del pantano. Al llegar al laboratorio, se trasladaba a un acuario con una capacidad de 32 litros. En el fondo del acuario se depositaban piedras con algas verdes recogidas en el propio pantano para proporcionar unas condiciones similares. El agua del acuario también procedía del pantano.

Las primeras recogidas se realizaron en los meses de Mayo, la segunda en

Septiembre y la última en Octubre.

La alimentación del zooplancton se consistía en fitoplancton filtrado y un suplemento de comida para peces que previamente se machacaba para convertirla en polvo muy fino, suplementado con un preparado comercial nutricional para artemias en cantidades mínimas.

La temperatura del agua era de 15-20°C. El agua se aireaba levemente con un difusor. Al ser sensibles al pH, este se mantenía ligeramente superior a 7.

Para la recogida de zooplancton del interior del acuario, se introducía un tubo sifón flexible, se sifonaba y se extraían 145 ml de agua con zooplancton para cada una de las distintas concentraciones del tóxico que se iban introduciendo en frascos de 200 ml y a los que se les añadían 5 ml de cada concentración de MeHg. Para cada 3 concentraciones de tóxico se utilizaba un control formado por un frasco con 150 ml del agua del acuario con zooplancton. Cada frasco iba etiquetado y reseñado debidamente.

Para la obtención de las distintas concentraciones tóxicas se parte de una solución stock de MeHg de 1.000 ppm y a partir de ésta se van haciendo diluciones hasta llegar a las distintas concentraciones (32 ppm, 16 ppm, 8 ppm, 4 ppm, 2 ppm, 1 ppm, 0.5 ppm, 0.25 ppm, 0.125 ppm, 0.0625 ppm, 0.0312 ppm, 0.015 ppm y 0.007 ppm). Para cada tres concentraciones se utilizaba un control, excepto en la última que se hizo sola y con un control.

El primer día, la intoxicación se hacía con las concentraciones 32 ppm, 16 ppm y 8 ppm junto con la muestra control número 1. El margen de tiempo entre cada muestra era de una hora y media (tiempo necesario de permanencia del zooplancton en la cámara fototóxica, filtración, conteo a través de la lupa, etc. e ir haciendo las intoxicaciones del día siguiente). Se mantenían con el tóxico durante 24 horas, al cabo de las cuáles, cada muestra se pasaba a una cámara de separación fototóxica (Fig. 6.20), en la que se colocaba un filtro textil y se esperaba hasta que se llenase la zona clara, después, se retiraba el filtro, se cubría la zona oscura con una tapa, provocando un oscurecimiento artificial y se conectaba una luz halógena de baja tensión con el fin de hacer pasar a la zona clara todos los crustáceos vivos y móviles con fototaxia positiva. Si la fototaxia es realmente positiva, al poner el foco de luz, los artrópodos se dirigen hacia ella. Se dejaba durante una hora y se procedía a la recogida. Esta operación se realizaba a primeras horas de la mañana, en las que los crustáceos tienen máxima actividad fototóxica.

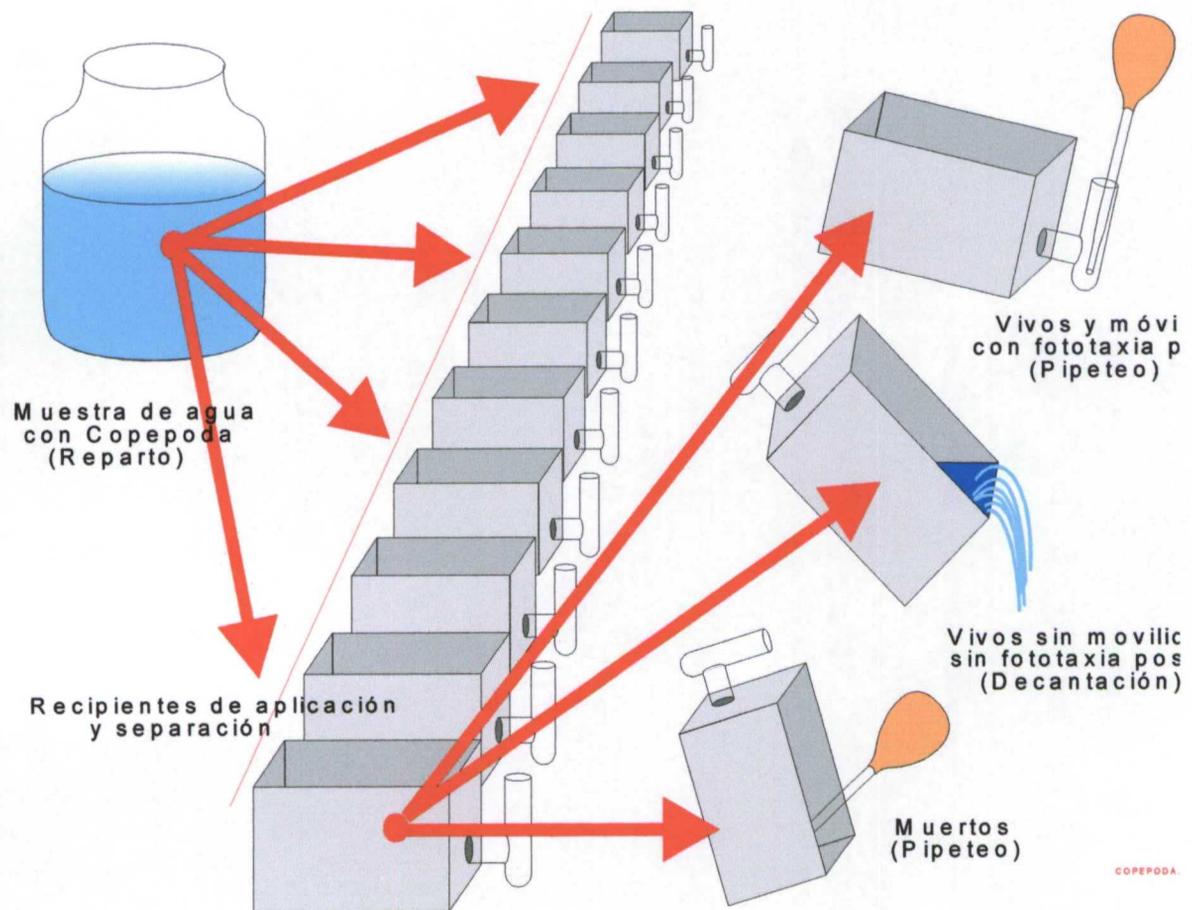


Fig. 6.20: Recogida de zooplancton de las cámaras de separación fototáxicas

En primer lugar, se recogían mediante pipeteo de separación con pera los crustáceos de la zona clara, que se pasaban posteriormente por un filtro de papel que se ponía en un pequeño embudo de vidrio. Luego se pasaba la muestra a un vidrio de reloj que contenía una mezcla de 90 partes de alcohol al 70% y 10 partes de glicerina para su

fijación. La mezcla se depositaba en tubos de laboratorio etiquetados de 5 ml para proceder al conteo de los crustáceos. Posteriormente, se recogían por decantación los crustáceos vivos sin movilidad o sin fototaxia positiva, se filtraban, se fijaban y se hacía la misma operación que en el caso anterior y, por último, se recogían por pipeteo los crustáceos muertos, se filtraban, se fijaban y se introducían en el tubo etiquetado.

Cada una de las muestras de los tubos de 5 ml, se pasaba a una rejilla PCX para su conteo a través de una lupa Askania SMT 4 y, una vez contados, se volvían a introducir en sus respectivos tubos etiquetados y se guardaban.

El segundo día, las intoxicaciones se hacían con las concentraciones 4 ppm, 2 ppm, 1 ppm y el control número dos para hacer la misma operación de permanencia en la cámara fototóxica, filtrado, conteo, etc. al día siguiente.

El tercer día, las intoxicaciones se hacían con las concentraciones 0.5 ppm, 0.25 ppm, 0.125 ppm y el control número tres.

El cuarto día, las intoxicaciones se hacían con las concentraciones 0.0625 ppm, 0.0312 ppm, 0.015 ppm y el control número cuatro, y el quinto y último día, se hacía la concentración 0.007 ppm y el control número cinco.

6.6. ASPECTOS ESTADÍSTICOS

La posible asociación de mortalidad y fototaxia con las concentraciones de MeHg, se ha analizado mediante tablas de contingencia 2 x 2 y estadísticos χ^2 / exacto de Fisher, construyéndose 4 x 13 tablas de contingencia para realizar los cuatro siguientes bloques de comparaciones:

- cada concentración tóxica con el control
- cada concentración tóxica con la ordinal superior (comparación intergrupo)
- la mortalidad del grupo control con cada concentración tóxica
- la mortalidad de cada concentración tóxica con la ordinal superior (comparación intergrupo)

De cada uno de estos bloques, se obtienen 13 significaciones con un intervalo de confianza (IC) del 95% (p del estudio < 0.05) Para anular el posible error tipo I de las comparaciones se ha disminuido el nivel de significación mediante la corrección de Bonferroni (P_c) que equivale al cociente entre el nivel de significación exigible al estudio (0.05) y el número de comparaciones que de antemano se ha previsto realizar (nc). De forma que:

$$P_c = 0.05 / nc$$

$$P_c = 0.05 / 13 = 0.038$$

considerándose significativas las diferencias si la p -asociada a cada estadístico era < 0.038 .

6.7. RESULTADOS

Muestra: Se manejó un total de 7231 ejemplares. Su distribución en función de las características fototáxicas y mortalidad se muestra numéricamente en la tabla 6.1 y porcentualmente en la Fig. 6.21.

Concentración MeHg (ppm)	Vivos Fototaxia(+)	Vivos Fototaxia (-)	Total vivos	Muertos	Total
32	2	26	28	846	874
16	14	99	113	831	944
8	13	121	134	700	834
4	23	170	193	559	752
2	21	67	88	249	337
1	10	117	127	134	261
0,5	15	70	85	112	197
0,25	11	114	125	266	391
0,125	8	66	74	168	242
0,062	24	82	106	242	348
0,031	43	71	114	101	215
0,015	33	28	61	62	123
0,007	34	32	66	53	119
Control	528	755	1283	311	1594
N=	779	1818	2597	4634	7231

Tabla 6.1: Distribución numérica del zooplanton en relación a la fototaxia y mortalidad.

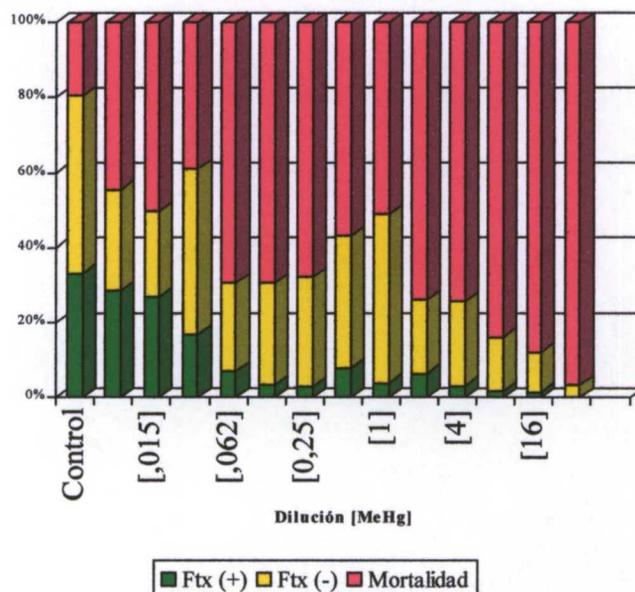


Fig. 6.21: Distribución porcentual de la fototaxia (Ftx) y mortalidad en el zooplanton

6.7.1. Fototaxia

Un 41.2% del zooplancton control emigró hacia la luz. La Fig. 6.22 muestra los índices de fototaxia de los crustáceos vivos en función de las diferentes concentraciones de MeHg.

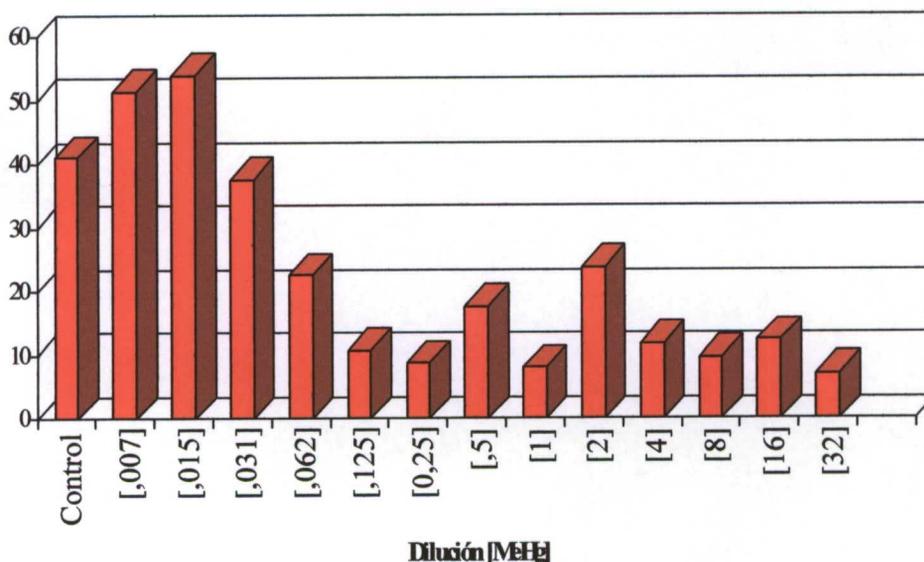


Fig. 6.22: Porcentajes de fototaxia positiva y [MeHg] en el zooplancton

Existió una asociación significativa entre la reducción de la fototaxia y las concentraciones de [MeHg] ($p < 0.030$). En las comparaciones con el control hubo diferencias muy significativas a partir de la concentración 0.062 ppm hasta la 32 ppm, ambas incluidas ($p < 0.001$) (Tabla 6.II).

Sin embargo, no se pudo demostrar que los índices de fototaxia positiva se correlacionaran significativamente con las diferentes concentraciones de MeHg.

6.7.2. Mortalidad

La mortalidad del grupo control fue de 19.5%. La mortalidad mayor (96.8%) correspondió a la concentración 32 ppm. Los índices de mortalidad aumentaron en relación al control de forma altamente significativa ($p < 0.001$) en todas las

concentraciones (Fig. 6.23).

Concentración A	Concentración B	χ^2	p
Control	0.007	2.36	0.12
	0.015	3.49	0.06
	0.031	0.37	0.53
	0.062	13.2	< 0.001
	0.125	25.7	< 0.001
	0.5	49.1	< 0.001
	1	17.4	< 0.001
	2	52.8	< 0.001
	4	9.54	< 0.001
	8	60.0	< 0.001
0.007	0.015	0.01	0.90
	0.031	3.69	0.05
	0.062	5.20	0.022
	0.125	3.40	0.82
	0.5	0.04	0.08
	1	2.88	0.05
	2	3.78	0.002
	4	9.51	0.01
	8	5.65	0.65
	16	0.20	0.63
0.015	0.031	0.22	0.73
	0.062		
	0.125		
	0.5		
	1		
	2		
	4		
	8		
	16		
	32		

Tabla 6.II: Diferencias entre porcentajes de fototaxia de las diferentes [MeHg] (Significación de Bonferroni para intervalo de confianza de 95%: $p < 0.038$)

ZOOPLANCTON

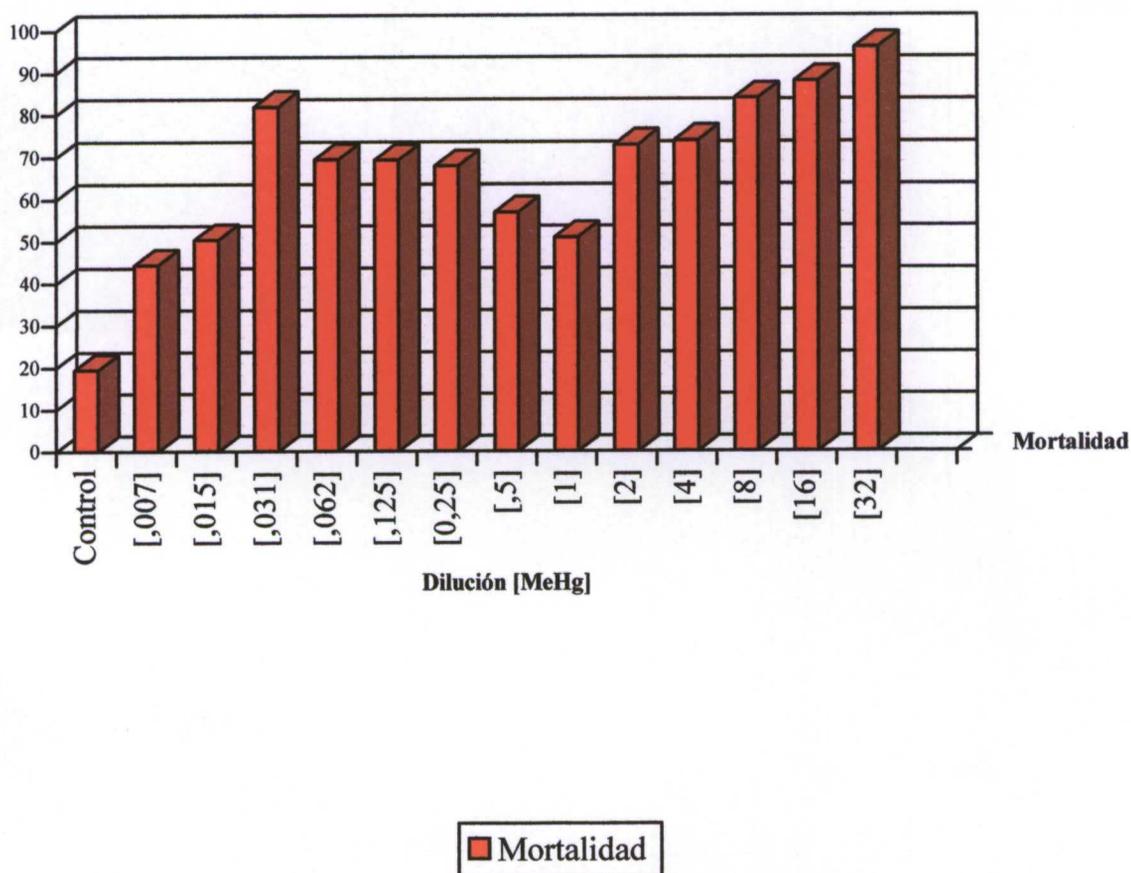


Fig 6.23: Porcentajes de mortalidad y [MeHg] en el zooplancton

La mortalidad de todas las concentraciones tóxicas difirió muy significativamente de la registrada en el control ($p < 0.001$). La tabla 6.III muestra las diferencias estadísticas entre los grupos.

Concentración A	Concentración B	χ^2	p
Control	0.007	39.9	< 0.001
	0.015	62.2	< 0.001
	0.031	79.7	< 0.001
	0.062	348.5	< 0.001
	0.125	268.8	< 0.001
	0.5	356.1	< 0.001
	1	133.4	< 0.001
	2	122.8	< 0.001
	4	396.8	< 0.001
	8	655.8	< 0.001
	16	932.4	< 0.001
0.007	0.015	0.61	0.43
	0.031	0.24	0.62
	0.062	27.4	< 0.001
	0.125	0.003	0.95
	0.5	0.07	0.78
	1	6.65	0.009
	2	1.15	0.28
	4	31.4	< 0.001
	8	0.00	0.93
	16	21.6	< 0.001
	32	5.87	0.015

Tabla 6.III: Diferencias entre la mortalidad de las diferentes concentraciones de MeHg (Significación de Bonferroni para intervalo de confianza de 95%: $p < .038$)

6.7.3. Capacidad biomedidora

Los porcentajes de mortalidad (M) se correlacionaron directa y significativamente con las concentraciones de MeHg, siendo la curva cúbica la que obtuvo el mejor ajuste ($r^2 = 0.98$; $p < 0.001$). La Fig. 6.24 muestra el diagrama de dispersión.

Zooplankton

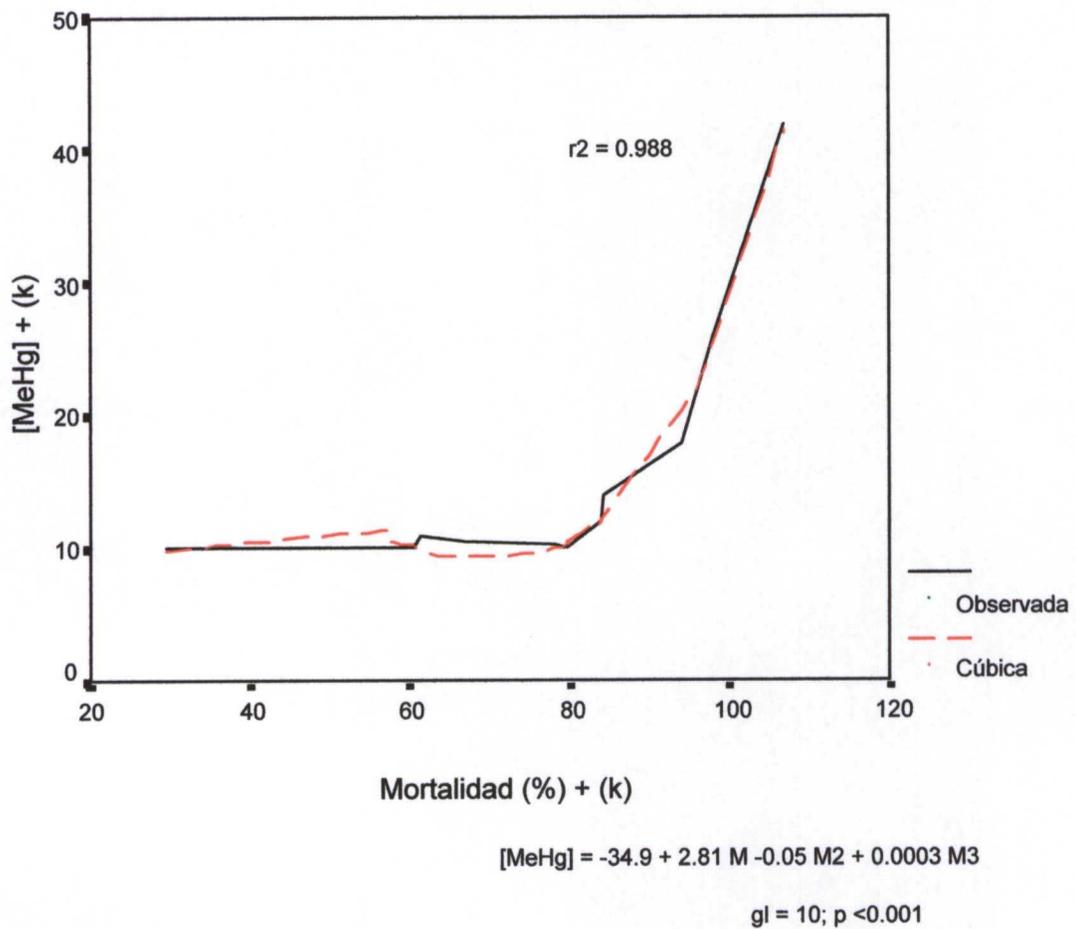


Fig. 6.24: Correlación entre los porcentajes de mortalidad y [MeHg] en el Zooplankton

Asimismo, se observó la existencia de correlación inversa y significativa entre los porcentajes de mortalidad y fototaxia en vivos, consiguiéndose el mejor ajuste con la curva cúbica ($r^2 = 0.612; p = 0.02$) (Fig. 6.25).

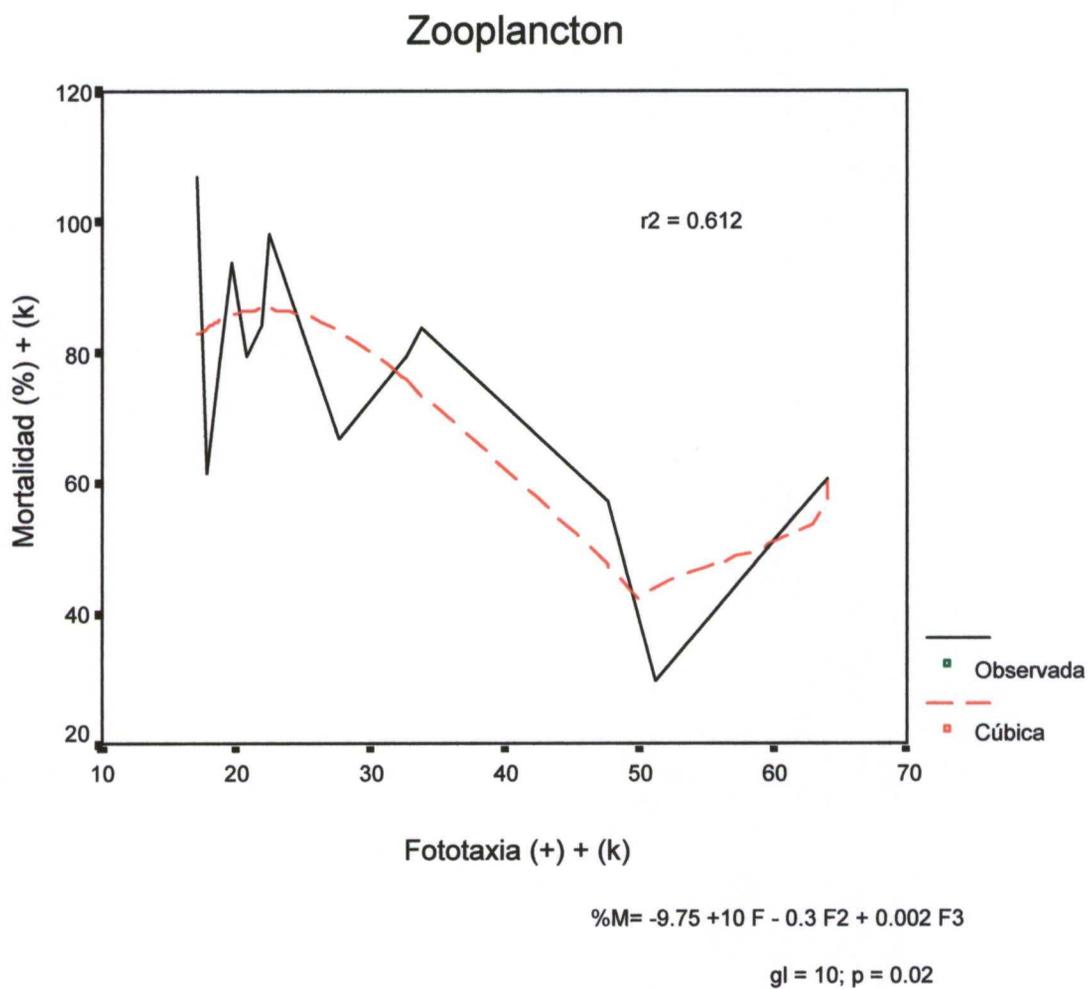


Fig. 6.25: Correlación entre los porcentajes de mortalidad y fototaxia en el Zooplankton

6.8. DISCUSIÓN

Las investigaciones de la repercusión hidrotóxica de los contaminantes medioambientales sobre el zooplancton, se han desarrollado especialmente en las aguas marinas, siendo más escasos los estudios sobre aguas dulces de ríos y lagos. El zooplancton constituye una de las fuentes alimenticias de los peces. En el caso del zooplancton dulceacuícola se ha podido cuantificar, mediante un estudio con brecas, que un 25% de la ingesta nutricional es aportada por estos crustáceos (Bodaly & Fudge, 1999). También conforma un indicador práctico de la toxicidad medioambiental a través de su capacidad de desarrollo, reproducción movilidad y mortalidad, siendo las especies de *Daphnia* los artrópodos más utilizados en los laboratorios.

Mediante el zooplancton se ha estudiado la toxicidad de diversos pesticidas y herbicidas (Nitschke et al., 1999; Cerejeira et al., 1998; Nebeker & Schuytema, 1998; Friedner y Klein, 1996; Guilhermino et al., 1999; Dodson et al., 1999), acaricidas (Villarroel, et al., 1999), hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHAs) (Hyotylainen y Oikari, 1999), metales pesados como el cadmio y el bromo (Guilhermino et al., 1999; Barata et al., 1999) y el metilmercurio (Chen y McNaught, 1992; Biesinger et al., 1982; Boudou y Ribeire, 1981), pirenos (Nikkila et al., 1999), alquilfenoles (Gerritsen et al., 1998) y efectos de vertidos industriales y de riego (Okamura et al., 1999; Hatch y Burton, 1999; Soucek et al., 2000).

Sin embargo, no se conoce con exactitud el mecanismo tóxico de actuación, si bien Friedner y Klein (1996) en su trabajo de la toxicidad del lindano sobre la mortalidad de los copépodos, han sugerido que los órganos más sensibles a los contaminantes son los ojos nauplius. Se ha demostrado que los contaminantes, al alterar el desarrollo, afectan al tamaño del animal y secundariamente a su velocidad de natación (Bailleuin et al., 1998) así como a su movilidad (Cerejeira et al., 1998). Se sabe que la sensibilidad a los tóxicos se relaciona con el tamaño (Gerritsen et al., 1998) y está influida por el efecto sinérgico de la radiación ultravioleta-B (Nikkila et al., 1999) y quizás del factor temperatura (Boudou y Ribeyre, 1981).

Hemos verificado que la exposición aguda al metilmercurio afecta significativa y negativamente a la supervivencia del zooplancton, incluso a partir de la concentración más baja, existiendo además, saltos significativos de mortalidad entre las concentraciones tóxicas mercuriales de 0.031 ppm, 2 ppm y 8 ppm; lo cual nos permite no sólo confirmar la opinión de Cerejeira (1998), tras su estudio de la toxicidad de pesticidas y herbicidas, sobre la validez de *Daphnia magna* como sencillo bioindicador medioambiental en la protección del medio acuático sino ampliar su utilidad para la

detección del metilmercurio. Nuestros hallazgos sobre la mortalidad son asimismo compatibles con los referidos por otros autores en *Daphnia pulex* (Chen y McNaught, 1992) y *Daphnia magna* (Biesinger et al., 1982).

Por otro lado, la excelente correlación, ajustada a una curva cúbica, obtenida entre las distintas concentraciones tóxicas y sus tasas específicas de mortalidad, también nos permite clasificar a estos artrópodos como biomedidores de gran utilidad para la semicuantificación de los niveles de contaminación medioambiental acuática por metilmercurio.

La peculiar capacidad fototáctica del zooplancton y su posible afectación por los tóxicos, conforma un apasionado campo de investigación. Para ello, se ha realizado el diseño de la cámara fototáctica, descrita anteriormente, a efectos de poder cuantificar esta capacidad "in situ" en un tiempo reducido (migración fototáctica horizontal).

El factor lumínico es el principal estímulo para la migración vertical (Siebeck, 1960; Ringelberg, 1964). De manera general, muchas especies migran desde la zona profunda hacia los estratos superficiales al acercarse el período de oscuridad. Debido a esta migración *nocturna*, se establece un máximo en las capas superficiales de agua entre el anochecer y el amanecer. En otros casos, se efectúa una migración *crepuscular*, con dos máximos en la superficie, uno al amanecer y otro al anochecer. Unas pocas especies, realizan una migración *inversa*, con un único máximo en la zona superficial durante el período de luz del día. Existe un ejemplo de la migración vertical más común en un lago relativamente transparente, el lago Michigan. Cuando se efectuó su muestreo, la población de *Daphnia*, tanto el ascenso del atardecer como el del amanecer se realizaban cuando variaba la intensidad de la luz en la zona profunda donde se encontraba la población. *Daphnia* tiene visión tricrómica, con un espectro de absorción que tiene sus puntos de máxima sensibilidad en la zona ultravioleta (370 nm), en la zona azul-violeta (435 nm), en la amarilla (570 nm) y posiblemente en la roja (685 nm). En la profundidad a la que se encuentra a mediodía, la luz ambiental es predominantemente verde. El fotosistema es más sensible en el azul y parece que está mejor adaptado a detectar cambios de intensidad a niveles bajos de energía. Sin embargo, durante el día pueden funcionar todos los fotosistemas en la detección de cambios de longitud de onda e intensidad a altos niveles de energía (McNaught y Hasler, 1966). La intensidad de luz es siempre la que marca la pauta.

Sin embargo, las respuestas ante cambios de luz pueden demostrarse tanto experimentalmente como en condiciones anormales de luz natural, como por ejemplo en

condiciones de semioscuridad durante un eclipse solar (Brigth et al., 1972). La función fototáctica del presente experimento se ha realizado con luz artificial, con una lámpara halógena de baja tensión. Para contrarrestar un posible instinto migratorio vertical, se ha hecho incidir la luz de la cámara en sentido lateral y se ha observado que, en relación al grupo control, la capacidad fototáctica se ha deprimido de forma aguda, global y significativamente por el efecto del tóxico. Sin embargo, en nuestra opinión, se deben establecer dos consideraciones sobre la forma en que esta afectación se realiza. En primer lugar, si bien es plausible que la depresión funcional sea primariamente originada por un efecto tóxico reductor, no se debe descartar una afectación secundaria a un efecto hipoquinético, asimismo tóxico, que redujera su capacidad de movimientos, puesto que éste, junto con una pérdida de equilibrio, es uno de los efectos probados de la intoxicación aguda por metilmercurio (Brunner y Stolle, 1995). Es decir, que el efecto tóxico podría actuar de dos formas distintas, no excluyentes y a dos niveles: una primera a nivel del sistema nervioso que produciría disminución de la sensibilidad a la luz como habían sugerido Fliedner y Klein (1996) y una alteración neurológica de la coordinación sin afectación muscular y una segunda que actuaría a nivel del sistema muscular, disminuyendo la capacidad de movimientos.

El efecto inmovilizador del zooplancton en aguas contaminadas fue estudiado por Cejeira et al. (1998). Bailleuil (1998) demostrando que la movilidad del zooplancton se relaciona directamente con el tamaño corporal y que en presencia de factores estresantes tienden inicialmente a reducir su velocidad para posteriormente adaptarse o morir de forma que, en opinión de Reinikainen (1998), la capacidad de las especies para adaptarse a factores agresivos, dependerá de la presencia de individuos capaces de responder adecuadamente a la exposición tóxica. Hay otras disquisiciones al respecto, tales como que, en presencia sostenida de tóxicos, la sensibilidad de los artrópodos depende, asimismo, del tamaño corporal (Gerritsen et al., 1998) y que la población se reduce tanto por el aumento de mortalidad como por la inhibición de la reproducción. En el caso que nos ocupa, entendemos que los últimos factores no han influido relevantemente en los resultados, dado que la intoxicación provocada fue aguda; de forma que, si bien se ha demostrado que a partir de la concentración 0.031 ppm, la fototaxia se reduce significativamente, siendo bioindicadora mercurial, es difícil averiguar, con los medios a nuestro alcance, el mecanismo exacto de tal reducción. Hacemos notar que, el hecho de que el incremento de la mortalidad entre las diferentes concentraciones se haya podido correlacionar inversamente con la capacidad fototáctica, apoyaría la posibilidad hipoquinética condicionada por una situación pre-mortem de los individuos.

En segundo lugar, de la observación de la figura 6.22, pudiera deducirse (dado que en ella rozamos la quasi-significación estadística) una tendencia al aumento, en relación al grupo control, de la fototaxia en presencia de las dos concentraciones más bajas utilizadas (0.015 ppm y 0.007 ppm, con $p = 0.12$ y 0.06 , respectivamente). Por tanto, quizás sería interesante establecer una nueva hipótesis de trabajo sobre un posible efecto de tales dosis de tipo fotoestimulador o magnificador de la capacidad motora ante el estrés tóxico en el intento de los individuos por sobrevivir o adaptarse.

Con independencia del mecanismo de acción, la reducción significativa de la fototaxia en presencia de metilmercurio, permite confirmar al zooplancton, a través de esta propiedad, como bioindicador mercurial bromatológico y piscícola de aguas continentales. La correlación inversa y ajustada a una curva cúbica existente entre fototaxia y concentraciones de metilmercurio, determina una aprovechable capacidad fototáctica biomedidora, si bien inferior, a la acreditada por la mortalidad ($r^2 = 0.61$ vs. 0.98 , respectivamente).

6.9. CONCLUSIONES

1.- El zooplancton se comporta como bioindicador significativo de la presencia de metilmercurio al incrementar el tóxico sus tasas de mortalidad ($p < 0.001$) y reducir su capacidad fototóxica ($p < 0.038$)

2.- Asimismo dispone de capacidad biomedidora significativa al correlacionarse directamente los diferentes niveles tóxicos con las tasas de mortalidad ($r^2 = 0.98$; $p < 0.001$) e inversamente con la capacidad fototóxica ($r^2 = 0.61$; $p < 0.02$), ambas demostradas sobre modelo de regresión de morfología cúbica.

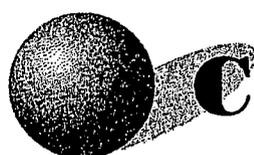
6.10. REFERENCIAS

1. Baillieul M; De-Wachter B; Blust R. Effect of salinity on the swimming velocity of the water flea *Daphnia magna*. *Physiol Zool*. 1998 Nov-Dec; 71 (6): 703-7.
2. Barata C; Baird DJ; Markick SJ. Comparing metal toxicity among *Daphnia magna* clones: an approach using concentration-time-response surfaces. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1999 Oct; 37 (3): 326-31.
3. Barrientos JA. In: Bases para un Curso Práctico de Entomología. Imprenta Juvenil S.A. Barcelona. 1988; 754 pp.
4. Bellan-Santini D. In: La Polución de las Aguas Marinas. Ed. Omega, S.A. Barcelona. 1979. 250 pp.
5. Biesinger KE; Anderson LE; Eaton JG. Chronic effects of inorganic and organic mercury on *Daphnia magna*: toxicity, accumulation, and loss. *Arch Enviro Contam Toxicol*. 1982 Nov; 11 (6): 769-74.
6. Bodaly RA; Fudge RJ. Uptake of mercury by fish an experimental boreal reservoir. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1999 Jul; 37 (1): 103-9.
7. Boudou A; Ribeyre F. Comparative study of the trophic transfer of two mercury compounds- $HgCl_2$ temperature. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1981 Nov; 27 (5): 624-9.
8. Brigh T; Ferrari, F; Martin D. and Franceschini G.A.Effects of a total solar eclipse on the vertical distribution of certain oceanic zooplakter. *Limnol. Oceanogr*. 17: 296-301. 1972.
9. Brunner B; Stolle A. Lead, cadmium and mercury carry-over to met products by spices and condiments. *Z. Ernährungswiss*. 1995; 34 (2): 113-7.
10. Cerejeira MJ; Pereira T; Silva-Fernandes A. Use of new microbiotets with *Daphnia magna* and *Selenastrum capricornutum* immobilized forms. *Chemosfere*. 1998 Dec; 37 (14-15): 2949-55.
11. Chen TY; McNaught DC. Toxicity of methylmercury to *Daphnia pulex*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1992 Oct; 49 (4): 606-12.
12. Cunningham L. Vertical migrations of *Daphnia* and copepods under the ice. *Limnol Oceanogr*. 1972; 17: 301-303.
13. Daan N; Ringelberg J. Further studies on the positive and phototactic reaction of *Daphnia*

magna Straus. *Netherlands J. Zool.*, 19: 525-540.

14. Dodson SI; Merritt CM; Torrentera L; Winter KM; Tornehl CK; Girvin K. Dieldrin reduce male production and sex ratio in *Daphnia galeata mendotae*. *Toxicol Ind Health*. 1999 Jan-Mar; 15 (1-2): 192-9.
15. Freeman WH; Bracegirdle B. Atlas de Estructura de Invertebrados. Ed. Paraninfo S.A. Madrid, 1982; 129 pp.
16. Friedner A; Klein W. Effects of lindane on the planktonic community in freshwater microcosms. *Ecotoxicol Environ Saf*. 1996 Apr; 33 (3): 228-35.
17. de la Fuente Freyre J.A. In: Zoología de Artrópodos. Ed. Interamericana. -Mc-GRAW-HILL. Madrid. 1994; 805 pp.
18. George DG; Edwards RW. *Daphnia* distribution within Langmuir circulations. *Limnol. Oceanogr*. 1973; 18: 798-800.
19. Gerritsen A; van der Hoeven N; Pielaat A. The acute toxicity of selected alkylphenols to young and adult *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 1998 Mar; 39 (3): 227-32.
20. Guilhermino L; Sobral O; Chastinet C; Ribeiro R; Gonçalves F; Silva MC; Soares AM. A *Daphnia magna* first-brood chronic test: An alternative to the conventional 21-Day chronic bioassay. *Ecotoxicol Environ Saf*. 1999 Jan; 42 (1): 67-74.
21. Hatch AC; Burton GA Jr. Sediment toxicity and stormwater runoff in a contaminated receiving system: consideration of different bioassays in the laboratory and field. *Chemosphere*. 1999 Sep; 39 (6): 10001-17.
22. Hyotylainen T; Oikari A. Assessment of toxicity hazards of dredged lake sediment contaminated by creosote. *Sci Total Environ*. 1999 Dec 15; 243-244: 97-105.
23. Mc Naught D. Depth control by planktonic cladocerans in Lake Michigan. *Publ Great Lakes Res Univ Mich*. 1966; 15: 98-108.
24. Mc Naught C and Hasler AD. Photoenvironments of planktonic Crustacea in Lake Michigan. *Ver. Limnol*. 1966; 16: 194-203.
25. Nebeker AV; Schuytema GS. Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms, and snails. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1998 Oct; 35 (3): 441-6.
26. Nieto Nafria JM; Mier Durante MP. In: Tratado de Entomología. Ed. Omega, S.A. Barcelona. 1985; 599 pp.

27. Nikkila A; Penttinen S; Kukkonen JV. UV-B-Induced acute toxicity of piren to the waterflea *Daphnia magna* in natural freshwaters. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1999 Nov; 44 (3): 271-9.
28. Nitschke L; Wilk A; Schussler W; Metzner G; Lind G. Biodegradation in laboratory activated sludge plants and aquatic toxicity of herbicides. *Chemosphere.* 1999 Dec; 39 (13): 2313-23.
29. Odum EP. *Ecología.* Ed. Interamericana, S.A., México. 3ª edición. 1972.
30. Okamura H; Omori M; Luo R; Aoyama I; Liu D. Application of short-term bioassay guided chemical analysis for water quality of agricultural land run-off. *Sci Total Environ.* 1999 Aug 30; 234 (1-3): 223-31.
31. Reinikainen M; Hietala J; Walls M. Adaptations and resistance of zooplankton to stress: effects of genetic, environmental, and physiological factors. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1998 May-Jun; 40 (1-2): 77-80.
32. Ringelberg J. The positively phototactic reaction of *Daphnia magna* Straus: A contribution to the understanding of diurnal vertical migration. *Netherlands J. Sea Res.* 1964; 2: 319-406.
33. Siebeck O. "Uferflucht" und optische Orientierung pelagischer Crustaceen. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 1968; 35: 1-118.
34. Siebeck O; Ringelberg J. Spatial orientation of planktonic crustaceans. I. The swimming behaviour in a horizontal plane. 2. The swimming behaviour in a vertical plane. *Verh Int Ver Limnol.* 1999; 17: 831-847.
35. Soucek DJ; Cherry DS; Trent GC. Relative acute toxicity of acid mine drainage water column and sediments to *Daphnia magna* in the Puckett's Creek Watershed, Virginia, USA. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2000 Apr; 38 (3): 305-10.
36. Villarroel MJ; Sancho E; Ferrando MD; Andreu-Moliner E. Effect of an acaricide on the reproduction and survival of *Daphnia magna*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1999 Aug; 63 (2): 167-73.
37. Wetzel RG. In: *Limnología.* Ed. Omega, S.A., Barcelona. 1981. 679 pp.
38. de Wilson MS; Yeatman RC. Freelifving copepoda. Edmondson WT, ed., *Freshwater Biology.* 2nd ed., copyright 1959 by John Wiley & Sons. New York. 1959.



CAPÍTULO 7

7. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL II: **ARTRÓPODOS TERRESTRES**

Los artrópodos tienen el cuerpo cubierto por un esqueleto externo o exoesqueleto, que sirve fundamentalmente para conferirles protección y para otras funciones estructurales (anclaje de músculos).

La mayor parte de los artrópodos pone huevos, aunque hay especies vivíparas. Al estar dotados de un esqueleto rígido, el crecimiento inevitablemente ha de producirse por “muda” periódica a lo largo de la vida. En los insectos, el crecimiento está asociado a un proceso complejo conocido como metamorfosis, que en el caso de los Orthoptera es de tipo gradual, durante la cual se van experimentando cambios progresivos de tipo morfológico a lo largo de su desarrollo.

Se han considerado los artrópodos terrestres más primitivos, los Ortópteros, cuyo nombre deriva de la palabra griega *ορθος* que significa recto o rígido, en referencia a sus alas anteriores más bien rectas.

Son insectos de tamaño medio a grande con el cuerpo robusto, dividido en tres partes: la cabeza, el tórax y el abdomen. La cabeza grande y roma con un par de antenas y el tórax con tres pares de patas y pronoto notorio en forma de silla. Las patas posteriores habitualmente están agrandadas y modificadas para el salto. Típicamente existen dos pares de alas, de las cuales las anteriores son más gruesas. Sin embargo, pueden estar reducidos o ausentes uno o los dos pares de alas. La forma de estos insectos es tan característica que, una vez conocidos, es imposible confundirlos con los miembros de cualquier otro orden.

Los saltamontes y los grillos comparten con los locutores de radio la prerrogativa de ser más conocidos por sus voces que por su aspecto debido a que, aunque estos insectos advierten ruidosamente su presencia, su coloración les permite pasar desapercibidos.

El “canto” de estos insectos se produce por un proceso llamado estridulación, que implica el frotamiento de una parte del cuerpo llamada “lima”, “raspa” o “hilera”, sobre otra parte llamada “raspador”. La lima está provista de una serie de diente-cillos o crestas que por turno tropiezan con el raspador y producen vibraciones. El raspador está siempre en el ala, pero la lima puede estar sobre la pata (saltamontes Celífera) o en el ala opuesta (grillos y saltamontes Ensífera). El paso de toda la lima sobre el raspador es habitualmente muy rápido y produce una pulsación corta de sonido (en realidad, son varias pulsaciones, una por cada diente o protuberancia cuando este tropieza con el raspador, pero esas pulsaciones pequeñas se siguen unas a otras tan rápidamente que se puede considerar que cada pasada de la lima produce una sola pulsación). Este es el mecanismo básico “productor de canto” de todos los estriduladores, pero el modelo de canto varía enormemente. Las pulsaciones se prolongan en expansiones súbitas o chirridos de duración variable, causados por el paso repetido de la lima sobre el raspador. Los saltamontes tienen una longitud de canto claramente fijada a una determinada temperatura y el canto se repite a intervalos regulares. Sin embargo, los grillos, no tienen una longitud de canto fijada de esa manera y en tiempo cálido producen el sonido indefinidamente (Chinery, 1977).

Los “oídos” con los que los insectos captan los sonidos son minúsculas membranas situadas en la base del abdomen en los saltamontes y en las patas delanteras en los grillos.

7.1. STEROPLEURUS STALI (BOLÍVAR, 1877)

7.1.1. Descripción

Esta especie de saltamontes, es un insecto que pertenece al Orden Orthoptera, Suborden Ensífera, Superfamilia Tettigonioidea, Familia Bradyporidae, Subfamilia Ehippigerinae y Género Uromenus (*Steropleurus*) (Heller et al., 1998).

La subfamilia Ehippigerinae reúne una serie de atributos que hacen que destaque entre las demás Subfamilias del Orden Orthoptera presentes en la Península Ibérica; el porcentaje de especies descritas en ella es muy grande, así como el de endemismos. Tratándose de animales que han perdido la facultad de volar, todo apunta hacia la posibilidad de que el foco inicial de dispersión se encuentre en la Península Ibérica, irradiando desde aquí a Centroeuropa, bajo Mediterráneo y al Norte de África,

donde son gradualmente sustituidas por otras Subfamilias. Por otra parte, la escasa movilidad de los Ehippigerinae les ha obligado a desarrollar una rica variedad de estridulaciones de llamada y diferenciación (Peinado, 1990; Peinado et al. 1987).

Los representantes de la Subfamilia Ehippigerinae, popularmente conocidos como chicharras en casi toda España, como carricantas o canturiñas en el Noroeste y como pantinganas en Cataluña, entre otros nombres menos usuales, son ortópteros ensíferos muy extendidos en la Península Ibérica. Los ehippigerinos machos (Fig. 7.1), son de fácil identificación, no tanto las hembras (Fig. 7.2). De tamaño grande, formas macizas y pesadas, carentes de alas, con las tegminas reducidas prácticamente a escamas sin más utilidad que la estridulación y con un ovipositor muy desarrollado en las hembras. El pronoto, con forma de silla de montar, muy característico que los diferencia de otros ortópteros carentes de alas. Coloración variable que va del amarillo al negro oliváceo, pasando por la gama de verdes. Puede presentar manchas de color morado o azulado, sobre todo en occipucio y abdomen.



Fig. 7.1: *Steropleurus stali* macho

Cabeza pequeña, amarillenta y con la parte dorsal algo azulada. Ojos salientes y globosos. Carecen de ocelos. Antenas, filiformes más largas que el cuerpo.



Fig. 7.2: *Steropleurus stali* hembra

Tórax, con pronoto grande y rugoso, más elevado en la metazona, con quillas laterales marcadas. Esta característica forma del pronoto, en “silla de montar”, es típica del grupo, y a ello debe el nombre e Ehippigerinae (Εφιππιυμ = silla de montar y γερω = llevar).

Las tegminas son escamiformes, convexas, parecidas en ambos sexos, reducidas casi exclusivamente al aparato estridulador. Reposan una sobre otra. Las alas están atrofiadas.

Las patas son generalmente largas y delgadas, sobre todo las posteriores, pero sin llegar a ser desproporcionadas. Los fémures del primer y segundo par son casi iguales, los del tercer par más desarrollados, pero incapaces, a pesar de todo, de hacerlos buenos saltadores. Las tibias presentan una hendidura o apertura timpánica.

Abdomen muy voluminoso, con terguitos de desarrollo normal y esternitos reducidos a puntos esclerificados.

El macho con cercos no cilíndricos y diente terminal romo. El titilador tiene el ápice de la rama interna aserrado.

El séptimo esternito de la hembra es liso. La placa subgenital no es cuadrada y el oviscapto es recto hasta poco antes del ápice, donde se incurva hacia arriba.

7.1.2. Biología

Tanto el macho como la hembra adultos son capaces de emitir sonido por frotamiento de las tegminas. La estridulación es breve y esporádica, lo que unido a una notable ventriloquía, dificulta la localización y la obtención de registros (Peinado, 1990).

Las hembras de esta familia de efipigerinas son únicas entre las Tettigoniidae (actualmente Bradyporidae), ya que poseen un aparato estridulador bien desarrollado, comparable al del macho, sobre las tegminas modificadas, aunque la lima está en el lado superior, por lo que morfológicamente es distinto al del macho. A pesar de tener esta estructura, las hembras sólo producen sonido como respuesta a los cantos del macho o cuando son molestadas (Hartley et al., 1974; Hartley, 1993). De hecho, se ha llamado canto de molestia (alarma) o protesta o reflejo de lloro (Dumortier, 1963b). Es un canto intermitente y variable y totalmente distinto a la estridulación normal que se escucha en el macho. Se han descrito los sonidos de respuesta de las hembras de algunas faneropterinas americanas (Fulton, 1933; Spooner, 1968) pero ninguna de ellas tiene la lima tan desarrollada como la que se encuentra en las efipigerinas.

La reproducción se realiza por medio de la colocación del espermatóforo a la hembra durante el acoplamiento, para lo cual el macho se sitúa encima, como en la mayoría de los insectos. La puesta tiene lugar preferentemente en terrenos poco compactos. La hembra hunde el ovipositor lo más vertical posible, ayudándose para su colocación de las patas, sobre todo al principio. Si el lugar le parece apropiado, deposita un huevo grande. Después extrae el ovipositor y se mueve un trecho antes de poner el siguiente. Las larvas son similares a los adultos, de los que se diferencian por la falta de desarrollo de los órganos estriduladores y de reproducción.

Sus hábitos alimentarios son fundamentalmente herbívoros, aunque no desdeñan alimentos animales. En cautividad aparece canibalismo y necrofagia, sin embargo en estado libre, su torpeza les priva, sin duda, de consumir con frecuencia presas animales.

En cuanto a los vegetales, prefieren brotes tiernos de casi todo.



7.1.3. Distribución

Se les puede encontrar activos a cualquier hora del día, de Junio a Octubre sobre *Lygos* (Retama) y *Genista* en las laderas de la montaña, sobre todo si están pobladas de pinos (Peinado, 1990).

Altitudinalmente ocupa las cotas situadas entre 1.400 y 1.800 m, manifestando clara preferencia por la banda más elevada. La ocurrencia de adultos tiene lugar entre los meses de Agosto y Octubre, ambos inclusive, con máxima generacional en el primer mes del ciclo para ambos sexos (Pardo González, 1992).

En España, se citan de Madrid (El Escorial, Peñalara, Cercedilla, Puertos de Navafría y de la Morcuera, Logroño (Ortigosa), Zaragoza (Moncayo), Segovia (San Ildefonso), Burgos, Cáceres (Montemayor) y en Portugal en Beira Litoral (Coimbra), Minho y Tras os Montes-Alto Douro (Sierra de Gerez). La localidad típica de esta especie es El Escorial (Peinado, 1990).

7.1.4. Capturas

Las capturas de las especies utilizadas en el trabajo se han hecho en Madrid, en los Puertos de Navafría (altitud 1.773 m) (Fig 7.3) y de la Morcuera (altitud 1.796 m),



Fig. 7.3: Puerto de Navafría

(Fig. 7.4) durante los meses de Agosto, Septiembre y Octubre.



7.2. *NEMOBIUS SYLVESTRIS* (Box, 1792)

7.2.1. Descripción

Esta especie de grillo es un insecto que pertenece al Orden Orthoptera, Suborden Ensifera, Familia Gryllidae y Género Nemobius.

La familia Gryllidae comprende una variada colección de grillos; estos tienen largas antenas (Fig. 7.5), como los Tettigoniidae, pero los tarsos tienen tres artejos (Ross, 1973) (los Tettigoniidae tienen tarsos con cuatro artejos). Especie de talla pequeña (1 cm de longitud), de color castaño oscuro, casi negro, excepto el pronoto, patas y cercos que son algo más claros y con alas cortas. Los machos con sus cortos muñones alares

pueden chirriar de forma constante y aguda, pero no pueden volar.

Aunque apenas conocemos al grillo de bosque, no podemos decir en absoluto que sea escaso. Su fino chirriar pasa desapercibido fácilmente.



Fig. 7.5: *N. sylvestris*

ADP

Por encima de las antenas salen dos líneas amarillas que se juntan en el centro y hacia arriba en una pequeña línea amarilla. Pronoto con el disco ligeramente convexo y largos y fuertes pelos negros. Las tegminas del macho (Fig. 7.6) sobrepasan la mitad del abdomen, las de la hembra (Fig. 7.7) sólo llegan a recubrir el segundo terguito abdominal. No tienen alas. Los cercos tanto del macho como de la hembra son muy largos, cónicos, y poseen numerosas sedas largas y finas. El abdomen de la hembra es más ancho que el del macho. Su oviscapto es largo, recto y terminado en punta, con los bordes superiores ligeramente serrados (Burgos et al., 1986).



Fig. 7.6: *Nemobius sylvestris* macho



Fig. 7.7: *Nemobius sylvestris* hembra

7.2.2. Biología

A diferencia de los *Steropleurus stali*, en el caso de los *Nemobius sylvestris* solamente canta el macho. Para atraer a la hembra, el macho chirría en dos registros sonoros: el acto de atracción y el suave de cortejo. Si se acerca una hembra dispuesta al apareamiento, el macho la palpa con las antenas. Si la hembra se somete quieta a la palpación, después de algún tiempo sigue la cópula. En el tiempo que sigue al celo, el macho se coloca todavía varias veces debajo de la hembra. A partir de los huevos puestos y dentro del mismo año salen las ninfas pequeñas, que invernan en la hojarasca. También las larvas grandes y los insectos adultos invernan, pero normalmente no suelen sobrevivir al invierno (Reichholf-Riehm, 1986).

Su ciclo completo dura aproximadamente dos años, desde la eclosión de los huevos hasta el estado adulto (Burgos y Herrera, 1986). Los huevos pasan el invierno en fase de reposo y, generalmente, empiezan a eclosionar en Junio. Las larvas realizan sus primeras mudas durante el verano, normalmente llegan a la quinta muda en otoño. En este estado pasan el invierno en fase de reposo: el crecimiento cesa y no realizan nuevas mudas. Las ninfas realizan su total actividad en Abril del año siguiente. La quinta muda finaliza pronto, y las tres últimas se producen durante Mayo y Junio. La ocurrencia de adultos tiene lugar a partir del mes de Junio, mientras que las larvas se presentan durante la primavera y el otoño. Los huevos se depositan uno a uno bajo la superficie del suelo. La hembra deposita un sólo huevo y luego retira gradualmente su ovipositor, de tal manera que llena el agujero con tierra. Continúa dejando huevos hasta el otoño, pudiendo llegar a poner 200 huevos una sola hembra. La mayoría de los adultos mueren al final del año, pero unos pocos sobreviven en el invierno y pueden encontrarse en la primavera siguiente (Ragge, 1965).

7.2.3. Distribución

Altitudinalmente ocupa las cotas medias, desde 800 m hasta los 1.050 m, sin mostrar clara preferencia por ninguna banda particular (Pardo, 1992).

En cuanto al hábitat, vive en bosques, entre hojarasca de bosques caducifolios, parece tener preferencia por las hojas de roble. Es activo durante el día. Respecto a su régimen alimenticio, es omnívoro en cautividad. En su medio natural probablemente predominen los alimentos vegetales (hongos en particular), complementados por pequeños insectos.

La mayor parte de los *N. sylvestris* utilizados en este estudio, se han encontrado en zonas donde se pueda encontrar hojarasca de caducifolios, especialmente de melojares (*Luzulo-Quercetum pyrenaicae*), incluso a cotas de hasta 1300 m.

Su distribución geográfica es: España (Canarias, Cuenca, Jaén, Madrid, Navarra, La Rioja, Salamanca, Segovia y Tarragona). Europa Central y Meridional, Gran Bretaña, Azores y Marruecos.

7.2.4. Capturas

Todas las capturas se han realizado en la vertiente Sur del Puerto de la Morcuera (Madrid) (Fig. 7.8) y de Navafría (Fig. 7.9), sobre hojas muertas de rebollo (*Quercus pyrenaica*) dentro del biotopo pastizal agostante bajo, durante los meses de Junio, Julio y Agosto.



Fig. 7.8: Puerto de la Morcuera



7.3. OBJETIVOS

7.4. MATERIAL Y MÉTODOS

7.3. OBJETIVOS:

•Estudiar si los ortópteros pueden actuar como posibles bioindicadores de los daños producidos por metales pesados (MeHg) mediante índice de mortalidad y estudio de supervivencia.

•Analizar los resultados de cada una de las especies por separado y , en caso positivo, comprobar cual actúa como mejor bioindicador.

7.4. MATERIAL Y MÉTODOS

7.4.1. Material:

- Agua destilada
- Aspirador para capturar insectos
- Cajas de madera numeradas
- Cajas de 2 compartimentos
- Difusores celulósicos estandarizados
- Etiquetas
- Frascos de cristal con tapón
- Frascos entomológicos
- Gradillas
- Insectarios para *N. sylvestris*
- Jaulas para *S. stali*
- Jeringas
- Pipetas graduadas
- Pipetas Pasteur
- Tóxico: MeHg
- Tubos de boca ancha
- Tubos para congelar insectos

7.4.2. Metodología

El trabajo de campo se llevó a cabo mediante frecuentes salidas para la recogida de material y su posterior observación en el laboratorio durante los meses de Agosto, Septiembre y Octubre para los *Steropleurus stali* y durante los meses de Junio, Julio y Agosto para los *Nemobius sylvestris*.

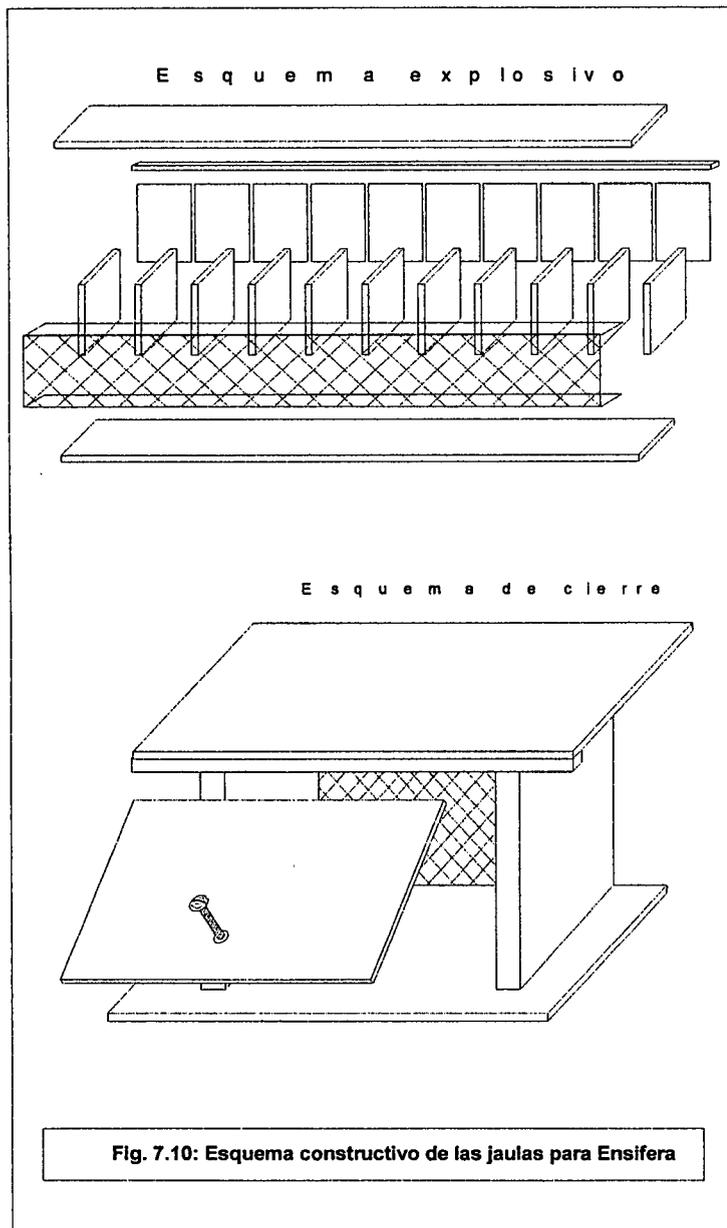
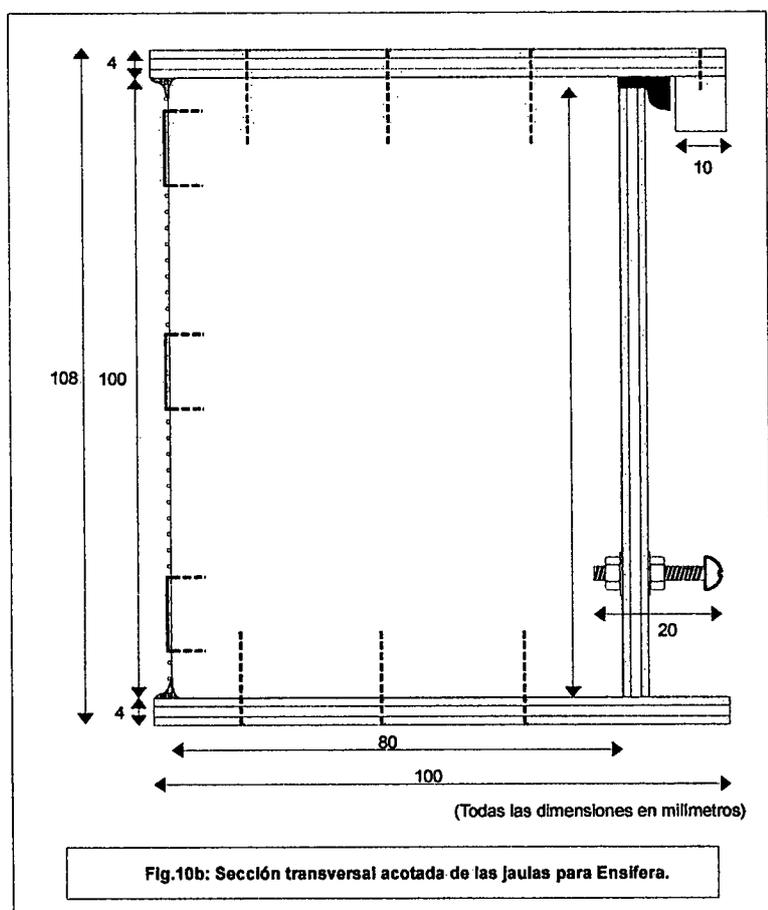


Fig. 7.10: Esquema constructivo de las jaulas para Ensifera

Las capturas de *S. stali* se realizaron a mano, introduciendo los ortópteros en tubos de boca ancha, cerrados con tapones previamente perforados para ventilación y que, posteriormente, se depositaban en unas cajas de madera numeradas. Una vez en el laboratorio, los ejemplares se trasladaban a insectarios.

Cada insectario estaba formado por diez jaulas individuales unidas y numeradas (Figs. 7.10 y 10b). En cada jaula había un recipiente para agua y otro para comida.

La alimentación era a base de verduras (lechuga, judías verdes, zanahoria, guisantes, etc.), que se alternaba con comida para hámsters.



Las capturas de *N. sylvestris* se realizaron mediante aspirador y posteriormente se depositaban en insectarios en los que previamente se preparaba el fondo con las mismas condiciones de humus y hojarasca de las zonas donde se habían recolectado. La alimentación era a base de vegetales.

Los experimentos se han hecho con una población de 149 ejemplares *Setopleurus stali* (32 machos y 116 hembras) y 229 ejemplares *Nemobius sylvestris*, distribuidos de la siguiente forma:

- **S. stali:**

A) Un grupo control formado por 16 ejemplares

B) Nueve grupos experimentales con distintas concentraciones tóxicas y distribuidas a su vez de la siguiente forma:

- 16 ejemplares de las concentraciones 1.95, 3.90, 7.81, 15.62, 31.25 y 125 ppm.
- 17 ejemplares de la concentración 62.5 ppm.
- 10 ejemplares de las concentraciones 250 y 500 ppm.

- **N. sylvestris:**

A) Un grupo control formado por 19 ejemplares

B) Nueve grupos experimentales, distribuidos a su vez de la siguiente forma:

- 10 ejemplares en las concentraciones 1.95, 3.90, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 100, 200, 250, 300, 400, 600, 700, 800 y 900 ppm.
- 20 ejemplares de las concentraciones 125, 500 y 1000 ppm.

Para la intoxicación de chicharras con MeHg, se introducían los ejemplares en cajas cerradas de dos compartimentos, etiquetadas con la fecha de la intoxicación y la concentración del tóxico. El tóxico se depositaba en difusores celulósicos estandarizados. Las concentraciones utilizadas del tóxico eran de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90 y 1.95 ppm de MeHg y la dosis para cada una de las concentraciones era de 5 ml. En los ejemplares control, se depositaban 5 ml de agua destilada en los difusores celulósicos. La intoxicación se realizaba a primeras horas de la mañana y la revisión se hacía cada 24 horas, retirando los ejemplares muertos que se introducían en tubos de cristal cerrados, etiquetados con la fecha de intoxicación, de muerte y la concentración del tóxico, para conservarlos en un congelador.

El material se encuentra depositado en el Instituto de Ciencias Ambientales (IUCA) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), en la sección de Biología y Sanidad Ambiental.

En la intoxicación de grillos se utilizaron dos tipos de concentraciones. En primer lugar, las diluciones se hicieron de forma lineal para obtener concentraciones de 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 ppm. y después se hicieron diluciones de forma exponencial, para obtener concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25,

15.6, 7.8, 3.9 y 1.95 ppm.

El día de la intoxicación se consideraba el día cero y se dejaban un máximo de veintiún días. El recuento se hacía cada veinticuatro horas. Cada mañana se contaban los ejemplares vivos y se retiraban los muertos.

7.5. RESULTADOS

7.5.1. Bioindicador: *Steropleurus stali* (Chicharra)

Muestra: Se estudiaron durante 14 días un total de 148 chicharras, 32 machos (21.6%) y 116 hembras (78.4%), distribuidas en subgrupos de 16 para el grupo control, 16 para cada una de las primeras siete concentraciones y 10 para cada una de las dos últimas. La tabla 7.1 muestra la distribución por sexos en relación a las diferentes concentraciones de MeHg.

DISTRIBUCIÓN POR SEXOS

Dilución		N	Sexo		Total
			Macho	Hembra	
Control	N		3	13	16
	(%)		18,8%	81,3%	100,0%
1.9	N		2	14	16
	(%)		12,5%	87,5%	100,0%
3.9	N			16	16
	(%)			100,0%	100,0%
7.8	N		3	13	16
	(%)		18,8%	81,3%	100,0%
15.6	N		2	14	16
	(%)		12,5%	87,5%	100,0%
31.25	N		3	13	16
	(%)		18,8%	81,3%	100,0%
62.5	N		3	13	16
	(%)		18,8%	81,3%	100,0%
125	N		5	11	16
	(%)		31,3%	68,8%	100,0%
250	N		5	5	10
	(%)		50,0%	50,0%	100,0%
500	N		6	4	10
	(%)		60,0%	40,0%	100,0%
Total	N		32	116	148
	(%)		21,6%	78,4%	100,0%

Tabla 7. I: Distribución por sexos de *S. stali* en las diferentes [MeHg]

El tiempo total medio de vida fue de 6.98 ± 3.0 días; 5.25 ± 2.2 días para el macho y 7.46 ± 3.0 para la hembra ($t = 3.77$; $p < 0.001$). La tabla 7.II muestra los tiempos de vida en relación al sexo y las concentraciones de MeHg.

Las varianzas fueron heterogéneas (Levene = 1.79; $p = 0.03$). El análisis de varianza demostró la existencia de asociación entre el tiempo de vida y la interacción formada por los factores sexo y [MeHg] ($F=2.66$; $p = 0.01$) (Fig. 7.11)

DILUCION	Sexo	Media	±DS	N
CONTROL	Macho	6,67	,58	3
	Hembra	8,00	2,55	13
	Total	7,75	2,35	16
1.9	Macho	10,00	,00	2
	Hembra	6,29	2,58	14
	Total	6,75	2,72	16
3.9	Hembra	7,13	2,73	16
	Total	7,13	2,73	16
7.8	Macho	4,67	2,08	3
	Hembra	8,46	2,03	13
	Total	7,75	2,49	16
15.6	Macho	8,50	2,12	2
	Hembra	8,07	2,89	14
	Total	8,13	2,75	16
31.25	Macho	5,33	1,53	3
	Hembra	8,92	2,40	13
	Total	8,25	2,65	16
62.5	Macho	5,00	2,65	3
	Hembra	5,92	3,15	13
	Total	5,75	3,00	16
125	Macho	4,60	1,95	5
	Hembra	9,91	3,86	11
	Total	8,25	4,17	16
250	Macho	4,20	1,92	5
	Hembra	4,20	2,28	5
	Total	4,20	1,99	10
500	Macho	3,67	,82	6
	Hembra	3,25	1,26	4
	Total	3,50	,97	10
Total	Macho	5,25	2,29	32
	Hembra	7,46	3,08	116
	Total	6,98	3,06	148

Tabla 7.II: Tiempos totales de vida en relación al sexo y [MeHg]

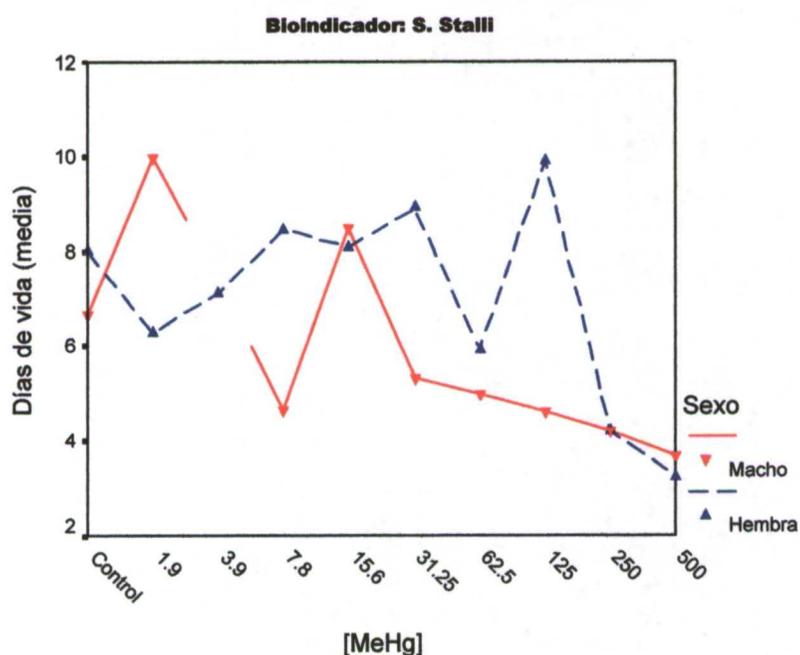


Fig. 7.11 Tiempo de vida (días) de *S. stali* en relación a la interacción [MeHg] y sexo

En las comparaciones múltiples intergrupos (Tabla 7.III), las diferencias en el tiempo de vida total con el grupo control aparecieron a partir de la concentración 250 ppm ($p = 0.02$).

[A]	[B]	(A-B) media	\pm DS	p
Control	1.95	1.00	0.91	1.00
	3.90	0.63	0.91	1.00
	7.81	0.00	0.91	1.00
	15.6	-0.38	0.91	1.00
	31.25	-0.50	0.91	1.00
	62.5	2.00	0.91	0.87
	125	-0.50	0.91	1.00
	250	3.55	1.04	0.02
	500	4.25	1.04	<0.001
1.95	3.90	-0.38	1.7	1.00
3.90	7.81	-0.63	1.7	1.00
7.81	15.6	-0.38	1.7	1.00
15.6	31.25	-0.13	1.7	1.00
31.25	62.5	2.50	1.7	0.56
62.5	125	-2.50	1.7	0.91
125	250	4.05	1.7	0.12
250	500	0.70	1.7	1.00

Tabla 7.III: Diferencias entre grupos (Estadístico de Tahmane)

Análisis de mortalidad en el tiempo:

La mortalidad total a los 14 días fue del 100 %. La tabla 7.IV muestra la frecuencia de muertes registradas a lo largo del tiempo de estudio.

El análisis Kaplan-Meier demostró diferencias significativas entre las mortalidad de las diferentes concentraciones de MeHg (Breslow total = 53.2; $gl = 9$; $p < 0.001$) (Fig. 7.12), que persistían al ajustarlas en relación al sexo. En las comparaciones pareadas las diferencias con el grupo control fueron significativas a partir de la concentración 250 ppm.

	DIAS	[MeHg]									Total	
		Control	1.9	3.9	7.8	15.6	31.25	62.5	125	250		500
	2		2					3		3	2	10
	3	1		2	1			1	2	1	2	10
	4		1	1	1	1	1	3	4	2	5	19
	5		3		2	3	2	2		1	1	14
	6	3	1	4		1	2	1		1		13
	7	4	2	3	2	3	3			2		19
	8	3	1	2	3	1		2	2			14
	9	3	3	1	4		1	1	2			15
	10	1	3	1	1	3	2	3	1			15
	11			1	1	3	4		1			10
	12				1		1					2
	13			1		1			1			3
	14	1							3			4
	Total	16	16	16	16	16	16	16	16	10	10	148

Tabla 7.IV: Número de muertes registradas en el tiempo de estudio en relación a [MeHg].

Steropleurus stali

[0] [1.9] [3.9] [7.8] [15.6] [31.2] [62.5] [125] [250] [500]

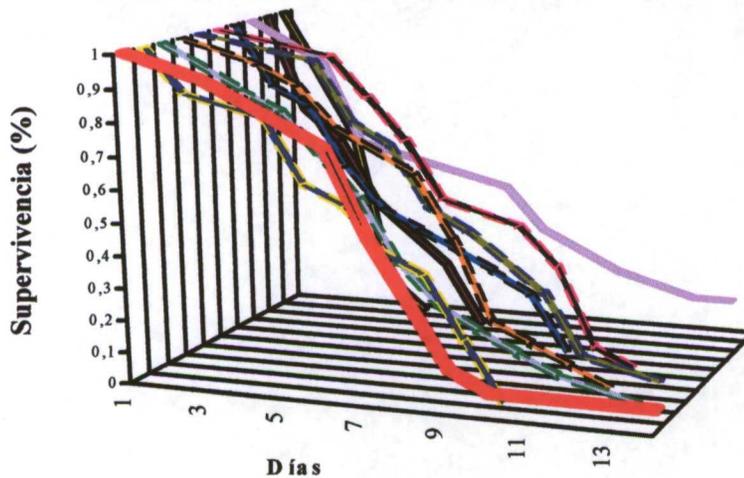


Fig. 7.12: Curvas de supervivencia en las diferentes [MeHg] durante 14 días.

Análisis de riesgos en el tiempo:

La regresión de Cox demostró riesgos significativos en las concentraciones 250 ppm ($RR_{aj} = 3.23$; IC 95% = 1.40 – 7.42) y 500 ppm ($RR_{aj} = 5.13$; IC 95% = 2.11 – 12.4). Asimismo se demostró que el riesgo de muerte era significativamente superior en el macho ($RR_{aj} = 1.61$; IC 95% = 1.01 – 2.54) . La tabla 7.V muestra el modelo regresivo definitivo.

VARIABLE	β	ES	RR_{aj}	IC 95%
Concentración				
Control	-	-	1	-
1.95	0.177	0.36	1.19	0.58 – 2.43
3.90	0.190	0.36	1.20	0.59 – 2.46
7.81	0.022	0.36	1.02	0.50 – 2.07
15.6	-0.200	0.36	0.81	0.40 - 1.60
31.25	-0.190	0.36	0.82	0.40 – 1.68
62.5	0.494	0.36	1.64	0.80 – 3.33
125	-0.496	0.38	0.60	0.28 – 1.29
250	1.149	0.42	3.15	1.37 – 7.28
500	1.611	0.45	5.01	2.05 – 12.2
Sexo				
Hembra = si	-	-	1	-
Macho = si	0.474	0.23	1.61	1.01 – 2.54

TABLA 7.V: Riesgos relativos ajustados de Cox (RR_{aj}): 2LL = 1178.4; χ^2 del modelo = 55.7; gl = 10; $p < 0.001$. (RR_{aj} = riesgo relativo ajustado; IC = intervalo de confianza).

Capacidad biomedidora

Al analizar la regresión de las concentraciones de MeHg sobre el tiempo medio de vida (T) se apreció una correlación inversa y significativa ($r = -0.935$; $r^2 = 0.875$; $p < 0.001$) en el ajuste a la curva cuadrática (Fig. 7.13) . De forma que:

$$[\text{MeHg}] = 1985 - 578.5 (T) + 41.9 (T)^2$$

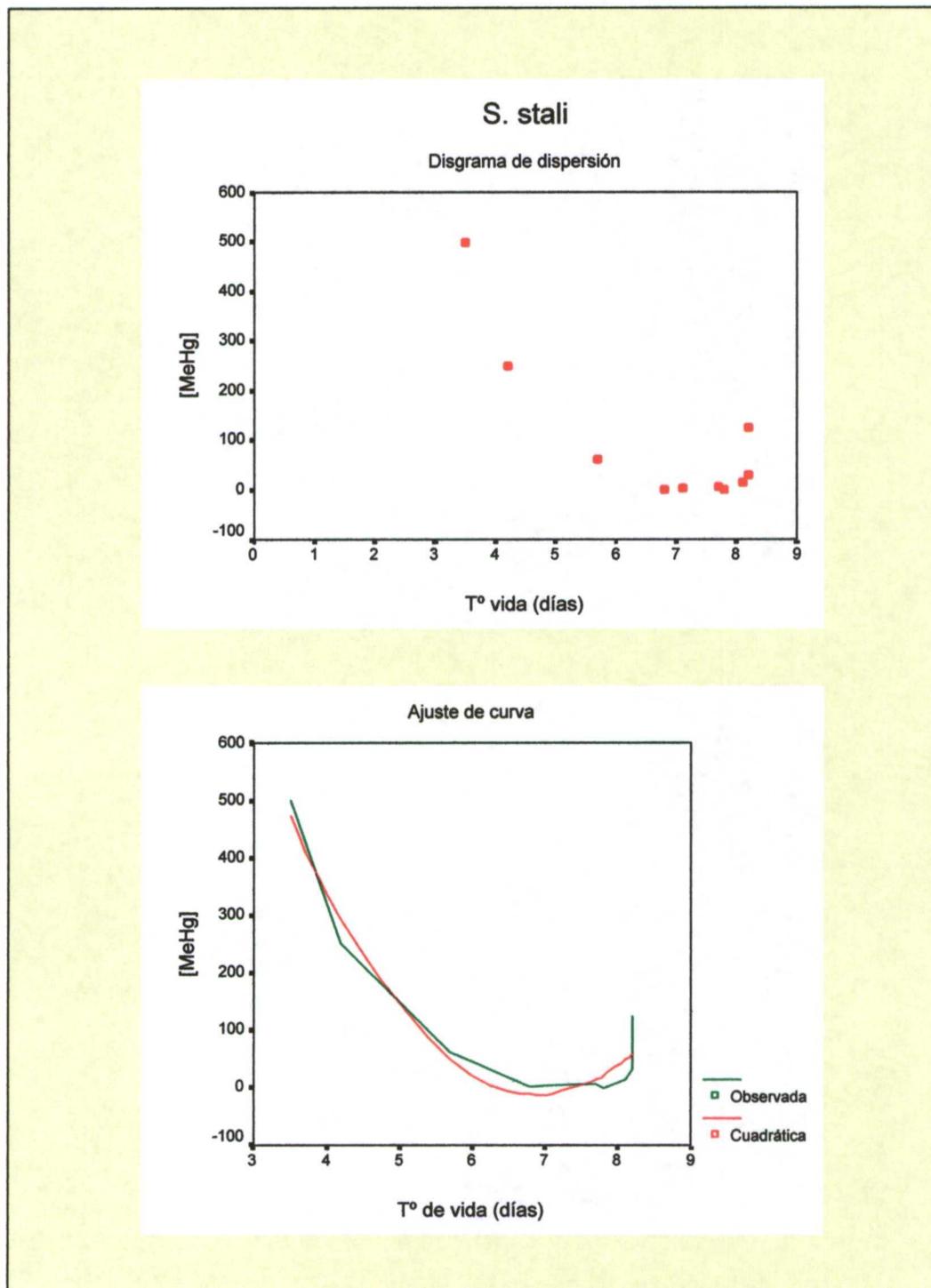


Fig. 7.13 Regresión de [MeHg] sobre el tiempo medio de vida

7.5.2. Bioindicador: *Nemobius sylvestris* (Grillo)

Muestra.- Se estudió una muestra de 229 grillos distribuida en una serie control de 19 elementos, diecisiete series de 10 elementos para las 19 concentraciones de MeHg con excepción de las concentraciones 125 y 1000 ppm que contaron con 20 elementos. El tiempo total de observación fue de 21 días.

Mortalidad

La tabla 7.VI muestra la distribución de la mortalidad en relación con concentración de MeHg.

[MeHg]	Control	N	STATUS		Total
			Viven	Mueren	
		N	15	4	19
		(%)	78,9%	21,1%	100,0%
[1.9]		N	3	7	10
		(%)	30,0%	70,0%	100,0%
[3.9]		N	2	8	10
		(%)	20,0%	80,0%	100,0%
[7.8]		N	4	6	10
		(%)	40,0%	60,0%	100,0%
[15.6]		N	7	3	10
		(%)	70,0%	30,0%	100,0%
[31.25]		N	7	3	10
		(%)	70,0%	30,0%	100,0%
[62.5]		N	7	3	10
		(%)	70,0%	30,0%	100,0%
[100]		N	5	5	10
		(%)	50,0%	50,0%	100,0%
[125]		N	13	7	20
		(%)	65,0%	35,0%	100,0%
[200]		N	4	6	10
		(%)	40,0%	60,0%	100,0%
[250]		N		10	10
		(%)		100,0%	100,0%
[300]		N		10	10
		(%)		100,0%	100,0%
[400]		N		10	10
		(%)		100,0%	100,0%
[500]		N		20	20
		(%)		100,0%	100,0%
[600]		N		10	10
		(%)		100,0%	100,0%
[700]		N		10	10
		(%)		100,0%	100,0%
[800]		N		10	10
		(%)		100,0%	100,0%
[900]		N		10	10
		(%)		100,0%	100,0%
[1000]		N		20	20
		(%)		100,0%	100,0%
Total		N	67	162	229
		(%)	29,3%	70,7%	100,0%

Tabla 7.VI: Mortalidad de *N. Sylvestris* en función de [MeHg]

El tiempo de vida medio fue de 10.3 ± 8 días correspondiendo a los muertos una media de 5.9 ± 4.9 días. Las varianzas fueron heterogéneas ($F = 12.1$; $p < 0.001$). El tiempo medio de vida se asoció significativamente con la interacción de los factores concentración y status al fin de estudio ($F = 3.18$; $gl = 9$; $p = 0.001$). La tabla 7.VII, muestra su distribución en relación a ambos factores y la fig. 7.14 gráfica el resultado de tal interacción.

[MeHg]	ESTADO	Media	± DS	N
Control	MUERTO	11,00	6,00	4
	VIVO	21,00	,00	15
	Total	18,89	4,85	19
[1.9]	MUERTO	10,86	5,46	7
	VIVO	21,00	,00	3
	Total	13,90	6,62	10
[3.9]	MUERTO	12,75	3,45	8
	VIVO	21,00	,00	2
	Total	14,40	4,62	10
[7.8]	MUERTO	13,33	4,97	6
	VIVO	21,00	,00	4
	Total	16,40	5,42	10
[15.6]	MUERTO	7,00	3,46	3
	VIVO	21,00	,00	7
	Total	16,80	6,96	10
[31.25]	MUERTO	12,33	1,53	3
	VIVO	21,00	,00	7
	Total	18,40	4,25	10
[62.5]	MUERTO	10,00	3,46	3
	VIVO	21,00	,00	7
	Total	17,70	5,56	10
[100]	MUERTO	9,80	6,61	5
	VIVO	21,00	,00	5
	Total	15,40	7,37	10
[125]	MUERTO	6,29	3,40	7
	VIVO	21,00	,00	13
	Total	15,85	7,45	20
[200]	MUERTO	13,83	3,97	6
	VIVO	21,00	,00	4
	Total	16,70	4,74	10
[250]	MUERTO	10,40	4,86	10
	Total	10,40	4,86	10
[300]	MUERTO	4,90	1,45	10
	Total	4,90	1,45	10
[400]	MUERTO	2,80	,92	10
	Total	2,80	,92	10
[500]	MUERTO	4,20	1,44	20
	Total	4,20	1,44	20
[600]	MUERTO	3,40	1,17	10
	Total	3,40	1,17	10
[700]	MUERTO	2,40	,84	10
	Total	2,40	,84	10
[800]	MUERTO	2,80	,92	10
	Total	2,80	,92	10
[900]	MUERTO	2,40	,70	10
	Total	2,40	,70	10
[1000]	MUERTO	1,45	,51	20
	Total	1,45	,51	20
Total	MUERTO	5,99	4,96	162
	VIVO	21,00	,00	67
	Total	10,38	8,01	229

Tabla 7.VII: Tiempos de vida (días) de *N. Sylvestris* en relación a [MeHg] y estado a los 21 días

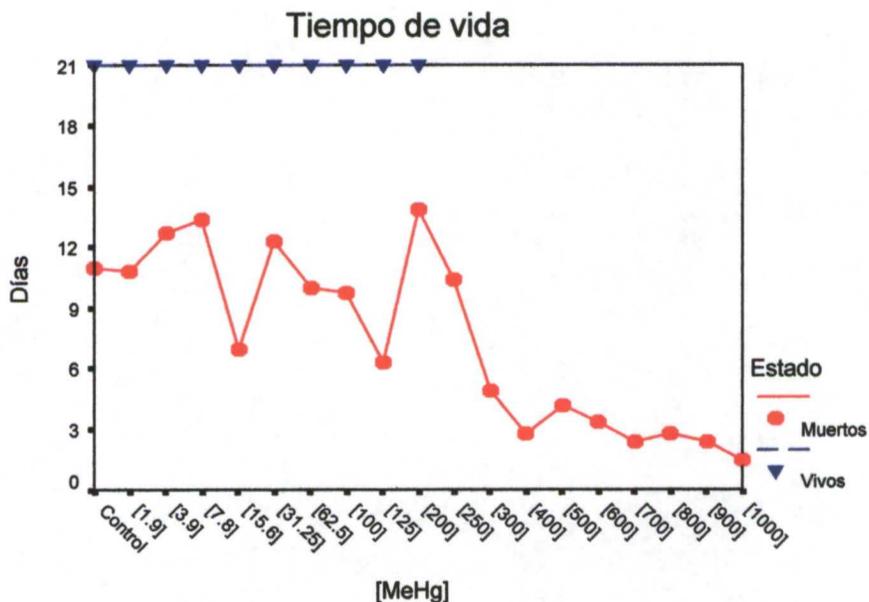


Fig. 7.14: Tiempo de vida de *N. Sylvestris* en relación a estado y [MeHg] a los 21 días

La tabla 7.VIII muestra las comparaciones múltiples, diferencias de los tiempos medios de vida entre grupos. En relación al grupo control aparecieron diferencias significativas a partir de la concentración 300 ppm ($p < 0.001$).

Concentración A	Concentración B	(A - B) media	±DS	p
Control	1.95	4.31	1.5	1.00
	3.90	3.91	1.5	1.00
	7.81	2.11	1.5	1.00
	15.6	2.01	1.5	1.00
	31.25	0.41	1.5	1.00
	62.5	1.11	1.5	1.00
	100	3.21	1.5	1.00
	125	0.91	1.5	1.00
	200	1.81	1.5	1.00
	250	9.01	1.5	0.08
	300	13.01	1.5	<0.001
	400	15.31	1.5	<0.001
	500	14.06	1.5	<0.001
	600	14.71	1.5	<0.001
	700	15.71	1.5	<0.001
800	15.31	1.5	<0.001	
900	15.71	1.5	<0.001	
1000	16.56	1.2	<0.001	
1.95	3.90	-0.4	1.7	1.00
3.90	7.81	-1.8	1.7	1.00
7.81	15.6	-0.1	1.7	1.00
15.6	31.25	-1.6	1.7	1.00
31.25	62.5	0.7	1.7	1.00
62.5	100	2.1	1.7	1.00
100	125	-2.3	1.7	1.00
125	200	0.9	1.7	1.00
200	250	7.20	1.7	0.59
250	300	4.0	1.7	1.0
300	400	2.3	1.7	0.04
400	500	-1.25	1.5	0.81
500	600	0.65	1.5	1.00
600	700	1.0	1.7	1.00
700	800	-0.4	1.7	1.00
800	900	0.4	1.7	1.00
900	1000	0.85	1.5	0.51

Tabla 7.VIII: Diferencias de tiempo medio de vida entre grupos (Estadístico de Tahmane)

Mortalidad en el tiempo de estudio

La mortalidad total fue de 70.7%. La del grupo control fue de 21.1 %. No hubo supervivencia a partir de la concentración 250 ppm. La tabla 7.IX muestra la distribución del número de muertes observadas en función del tiempo y concentraciones.

[MeHg]	T° vida																					Total
	1	2	3	4	6	7	9	10	11	12	13	14	15	17	18	19	20	21				
Control					2							1			1			15	19			
[1.9]				1		2			2						2			3	10			
[3.9]									2	1	2	1					1	2	10			
[7.8]										1		1				2		4	10			
[15.6]									1									7	10			
[31.25]									1	1		1						7	10			
[62.5]					1						2							7	10			
[100]			1	1				1				1				1		5	10			
[125]		2			2		1		1									13	20			
[200]								1	2			1		1		1		4	10			
[250]				1	1	3					1	1	1	1			1		10			
[300]			3	1	6														10			
[400]	1	2	5	2															10			
[500]	1	2	1	8	2	1													20			
[600]	1	1	2	5															10			
[700]	2	2	6																10			
[800]	1	2	5	2															10			
[900]	1	4	5																10			
[1000]	11	9																	20			
Total	18	24	28	21	14	6	1	2	9	6	4	6	1	1	3	4	2	67	229			

Tabla 7.IX: Frecuencia de muertes en el tiempo

La mortalidad en el tiempo difirió significativamente entre las diferentes concentraciones (Breslow = 305.5; gl = 18; $p < 0.001$) (Figs. 7.15 y 7.16). En relación al control, las diferencias en las curvas de supervivencia fueron significativas para las concentraciones 1.9 y 3.9 ppm y desde la 250 a la 1000 ppm ($p < 0.05$).

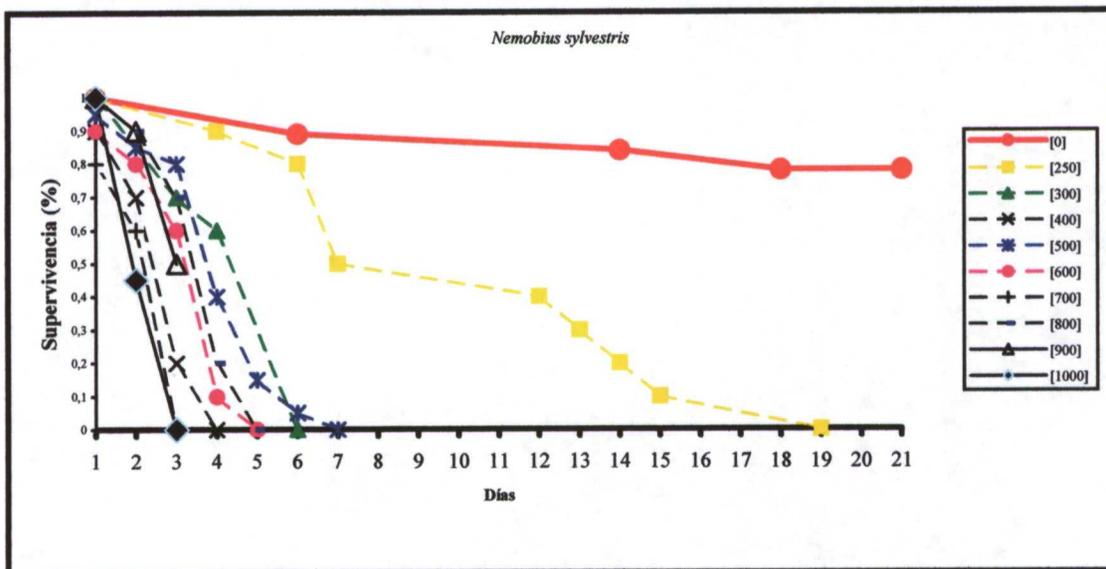


Fig. 7.15: Curvas de supervivencia del control y de [250] a [1000] ppm. de MeHg

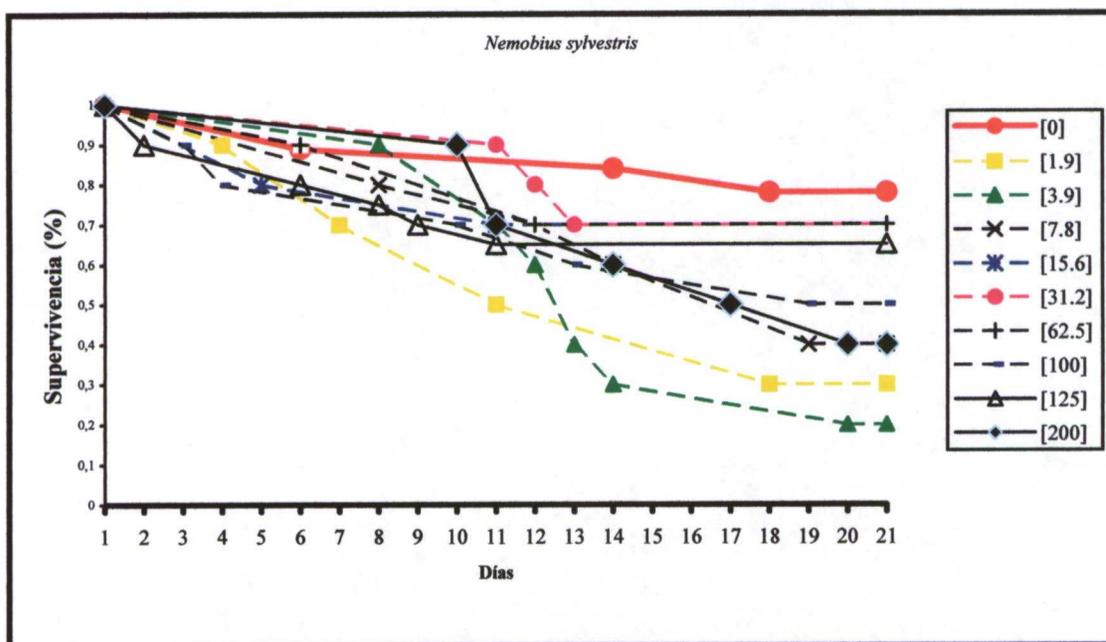


Fig. 7.16: Curvas de supervivencia del control y de [1.9] a [200] ppm. de MeHg

Análisis de riesgos en el tiempo

La regresión de Cox, confirmó que, si bien todas las concentraciones de MeHg se comportaron como factores de riesgo ($RR_{aj} > 1$), fueron significativas las concentraciones 1.95 y 3.90 ppm y desde la 250 a la 1000 ppm de MeHg. La tabla 7.X

muestra los riesgos relativos y su intervalo de confianza.

VARIABLE	β	ES	RR	IC 95%
Concentración				
Control	-	-	-	-
1.95	1.58	0.62	4.87	1.42 – 16.7
3.90	1.62	0.61	5.08	1.52 – 16.96
7.81	1.19	0.64	3.29	0.92 – 11.67
15.6	0.51	0.76	1.66	0.37 – 7.44
31.25	0.37	0.76	1.45	0.32 – 6.49
62.5	0.43	0.76	1.53	0.34 – 6.87
100	1.11	0.67	3.04	0.81 – 11.32
125	0.72	0.62	2.06	0.60 – 7.04
200	1.19	0.64	3.29	0.92 – 11.67
250	2.25	0.59	9.53	2.96 – 30.73
300	3.69	0.64	40.21	11.42 – 141.47
400	5.17	0.67	177.47	47.06 – 669.26
500	4.1	0.6	60.78	18.53 – 199.29
600	4.66	0.66	105.82	28.61 – 391.31
700	5.58	0.69	266.35	68.80 – 1031.18
800	5.17	0.67	177.47	47.06 – 669.26
900	5.64	0.69	282.13	72.77 – 1093.75
1000	6.69	0.67	810.99	214.63 – 3064.39

Tabla 7.X: Riesgos relativos de Cox : $-2LL = 1341.3$; χ^2 del modelo = 316.8; gl = 18; $p < 0.001$
(RR_{aj} = riesgo relativo ajustado; IC = intervalo de confianza)

Capacidad biomedidora

Al analizar la regresión de las concentraciones de MeHg sobre el tiempo medio de vida (T) se apreció una correlación inversa y significativa ($r = -0.935$; $r^2 = 0.875$; $p < 0.001$) (Fig. 7.17) . De forma que:

$$[\text{MeHg}] = 1012.7 - 128.4 (T) + 4.22 (T)^2$$

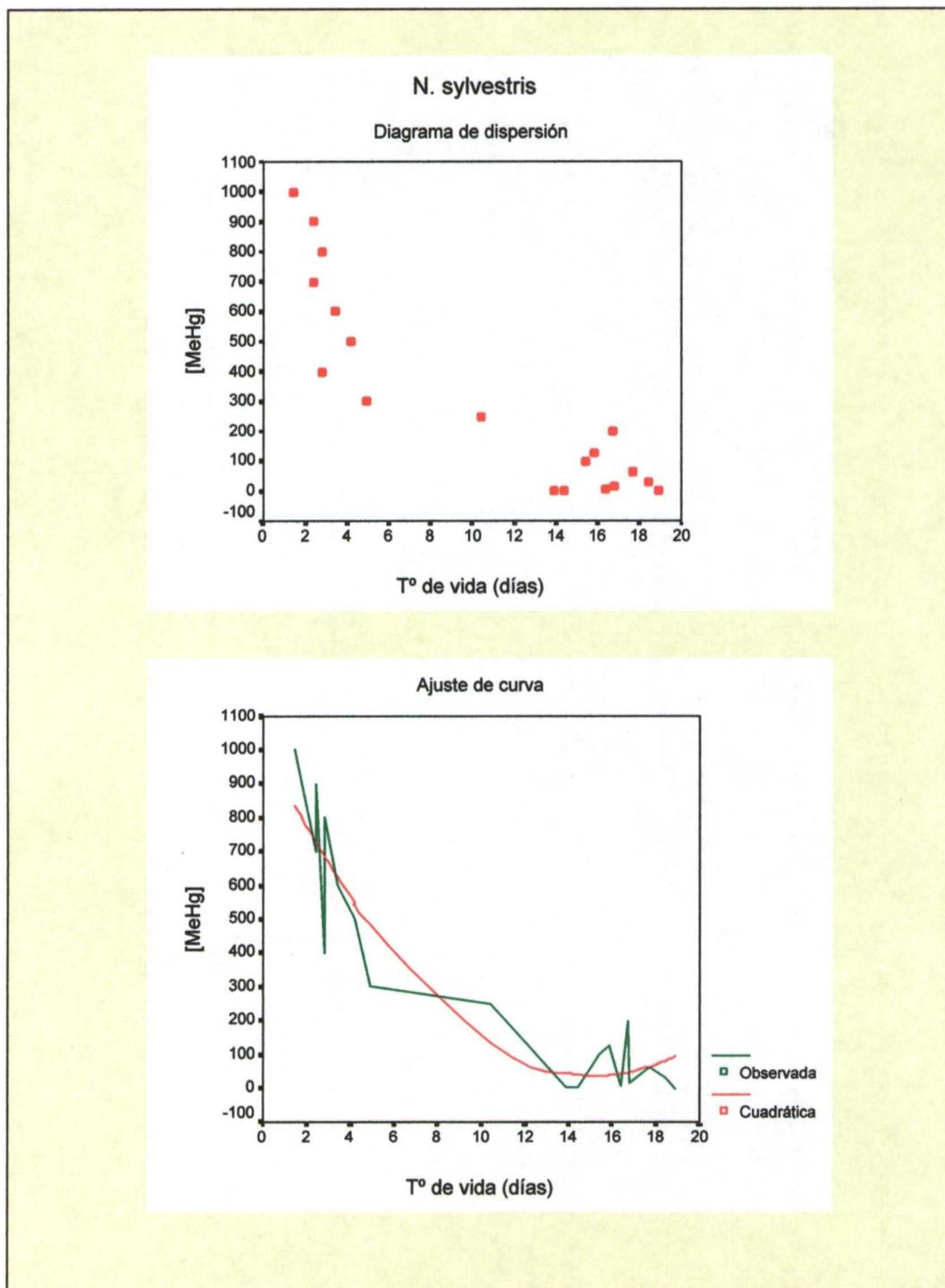


Fig. 7.17: Regresión de [MeHg] sobre el tiempo medio de vida

7.5.3. Estudio comparativo de los ortópteros

Muestra.- Se compararon las poblaciones de chicharras y grillos que fueron sometidos a los efectos de una misma concentración de MeHg, realizándose un punto de corte en el estudio a los 14 días. De forma que la muestra total abarcó un total de 277 insectos durante el tiempo reseñado. De ellos, 148 (53.4%) eran grillos y 129 chicharras (46.6 %). El tiempo de observación común fue de 14 días. La tabla 7.XI muestra la distribución del número de muertes en el tiempo.

Días	Contro	[1.9]	[3.9]	[7.8]	[15.6]	[31.2]	[62.5]	[125]	[250]	[500]	Total	
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	(%)
1										1	1	.4%
2		2					3	2	3	4	14	5,1%
3	1		2	1			1	2	1	3	11	4,0%
4		2	1	1	1	1	3	4	3	13	29	10,5%
5		3		2	5	2	2		1	6	21	7,6%
6	5	1	4		1	2	2	2	2	2	21	7,6%
7	4	4	3	2	3	3			5	1	25	9,0%
8	3	1	3	5	1		2	3			18	6,5%
9	3	3	1	4		1	1	3			16	5,8%
10	1	3	1	1	3	2	3	1			15	5,4%
11		2	3	1	4	5		2			17	6,1%
12			1	2		2	2		1		8	2,9%
13			3		1			1	1		6	2,2%
14	18	5	4	7	7	8	7	16	3		75	27,1%
Total	35	26	26	26	26	26	26	36	20	30	277	100,0%

Tabla 7.XI: Distribución de muertes en un tiempo de 14 días

El tiempo de vida medio fue de 8.7 ± 4.0 días, correspondiendo a las chicharras 6.9 ± 3.0 días y a los grillos 10.8 ± 4.1 días. Los tiempos medios se asociaron significativamente con la interacción entre las diferentes concentraciones y tipo de bioindicador ($F = 2.44$; $gl = 9$; $p = 0.01$), siendo sus varianzas heterogéneas (Levene: $F = 4.13$; $p < 0.001$). La tabla 7.XII muestra el efecto de la interacción y la fig. 7.18 lo grafica.

[MeHg]	Bioindicador	Mean	Std. Deviation	N
Control	Chicharras	7,75	2,35	16
	Grillos	13,16	2,52	19
	Total	10,69	3,64	35
[1.9]	Chicharras	6,75	2,72	16
	Grillos	11,00	3,74	10
	Total	8,38	3,73	26
[3.9]	Chicharras	7,13	2,73	16
	Grillos	12,40	1,96	10
	Total	9,15	3,56	26
[7.8]	Chicharras	7,75	2,49	16
	Grillos	12,60	2,50	10
	Total	9,62	3,43	26
[15.6]	Chicharras	8,13	2,75	16
	Grillos	11,90	3,75	10
	Total	9,58	3,62	26
[31.25]	Chicharras	8,25	2,65	16
	Grillos	13,50	1,08	10
	Total	10,27	3,38	26
[62.5]	Chicharras	5,75	3,00	16
	Grillos	12,80	2,53	10
	Total	8,46	4,47	26
[125]	Chicharras	8,25	4,17	16
	Grillos	11,30	4,23	20
	Total	9,94	4,42	36
[250]	Chicharras	4,20	1,99	10
	Grillos	9,80	3,94	10
	Total	7,00	4,18	20
[500]	Chicharras	3,50	,97	10
	Grillos	4,20	1,44	20
	Total	3,97	1,33	30
Total	Chicharras	6,98	3,06	148
	Grillos	10,85	4,16	129
	Total	8,78	4,09	277

Tabla 7.XII: Tiempos medios de vida en relación a [MeHg] y tipo de ortóptero

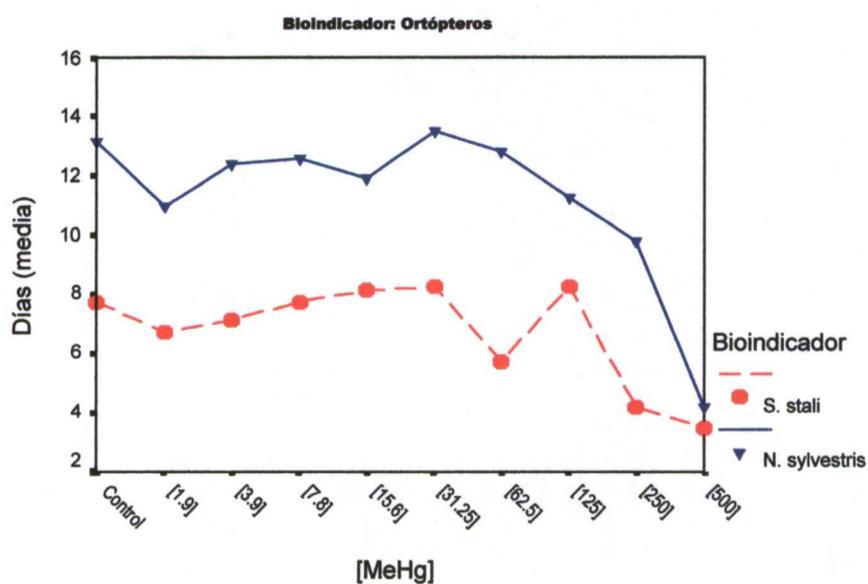


Fig. 7.18: Interacción entre tipo de ortóptero y [MeHg]

En las diferencias pareadas intergrupos con el control fue significativa la concentración 500 ppm ($p < 0.001$).

Mortalidad en el tiempo

En el análisis de mortalidad en el tiempo de 14 días en función de las diferentes concentraciones y estratificado en función de los dos ortópteros, hubo diferencias significativas totales (Breslow = 152.9; $gl = 9$; $p < 0.001$), entre los grillos (Breslow = 53.2; $gl = 9$; $p < 0.001$) (Fig. 7.19); entre las chicharras (Breslow = 119.5; $gl = 9$; $p < 0.001$) (Fig. 7.20) y entre ambos bioindicadores en las concentraciones 1.9 ppm ($p = 0.04$), 62.5 ppm ($p = 0.03$), 250 y 500 ppm ($p < 0.001$)

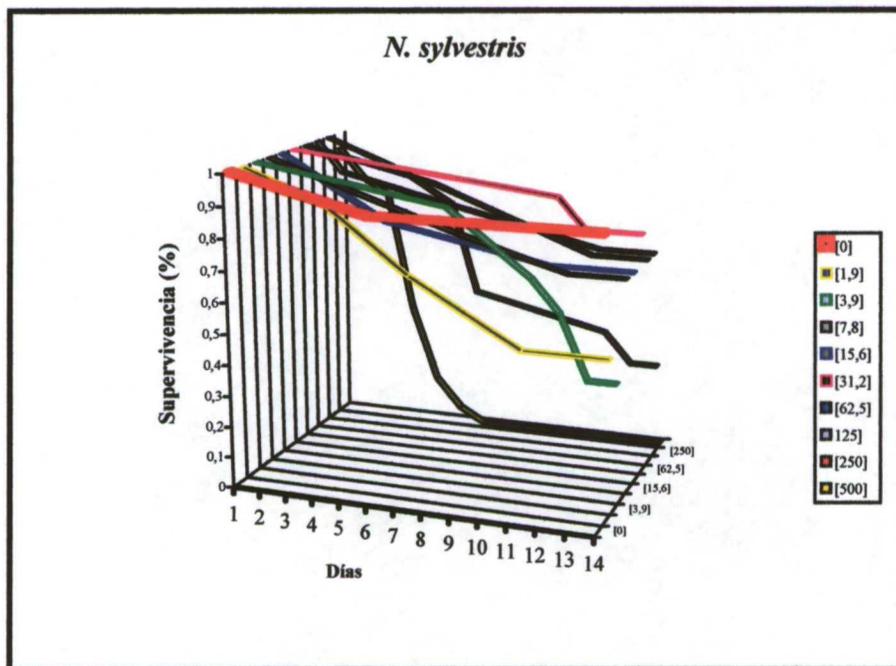


Fig. 7.19: Curvas de supervivencia de *N. Sylvestris* a 14 días

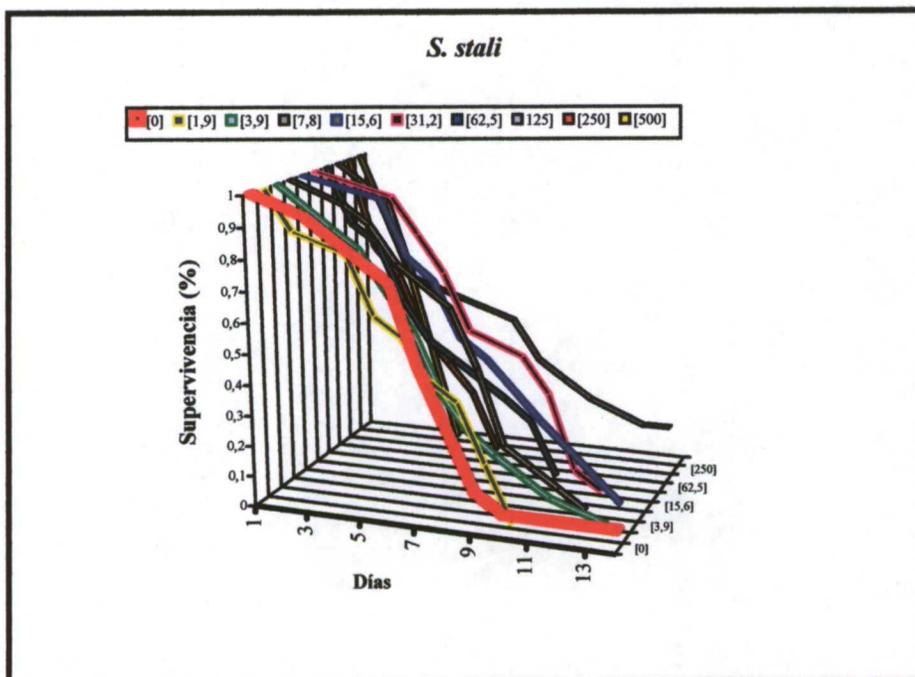


Fig. 7.20 : Curvas de supervivencia de S. Stali a 14 días

Riesgos de mortalidad

Aunque en la regresión de Cox todas las concentraciones tóxicas se comportaron como factor de riesgo en contraste con el control ($RR_{ajj} > 1$), la significación del riesgo relativo ajustado apareció a partir de 250 ppm ($RR_{ajj} = 1.03$; IC 95% = 2.08 – 8.10) (Tabla 7.XIII). La chicharra presentó un riesgo significativamente mayor que el grillo ($RR_{ajj} = 5.52$; IC 95% = 3.95 – 7.71).

VARIABLE	β	ES	RR _{aj}	IC 95 %
[MeHg]				
Control	-	-	1	-
[1.9]	0.614	0.32	1.84	0.97 – 3.51
[3.9]	0.523	0.32	1.68	0.89 – 3.18
[7.8]	0.267	0.33	1.30	0.67 – 2.52
[15.6]	0.181	0.34	1.19	0.62 – 2.31
[31.2]	0.639	0.33	1.06	0.54 – 2.07
[62.5]	0.638	0.33	1.89	0.98 – 3.64
[125]	0.033	0.34	1.03	0.53 – 1.98
[250]	1.413	0.33	4.11	2.08 – 8.10
[500]	2.849	0.17	17.2	9.00 – 33.1
Bioindicador				
<i>N. sylvestris</i>	-	-	1	-
<i>S. stali</i>	1.70	0.17	5.52	3.95 – 7.71

Tabla 7.XIII: Análisis de riesgos relativos ajustados (RR_{aj}) de Cox (-2LL = 1902.3; χ^2 del modelo = 217.4; gl = 10; p < 0.001)

7.6. DISCUSIÓN

Se reconoce que los insectos tienen un potencial enorme y desaprovechado como biomonitores de la contaminación de la naturaleza por metales pesados, habiéndose estudiado la toxicidad consiguiente a nivel celular, tisular, poblacional y comunitaria, si bien la mayoría de los datos disponibles se fundamentan en estudios experimentales en laboratorio (Hare L, 1992). Por ello es difícil extrapolar los datos a los insectos en libertad natural. Sin embargo, los escasos estudios existentes al respecto sugieren que los contaminantes metálicos afectan tanto a la distribución como a la abundancia de los insectos, especialmente acuáticos.

Nuestra investigación se ha centrado en dos animales peculiares pero típicos de la comunidad de Madrid: chicharras y grillos. Y hasta donde llega nuestro conocimiento es la primera vez que sobre tales insectos se intenta cuantificar el efecto del MeHg.

Sí se ha estudiado una especie similar, el *Stethophyma grossum* (no presente en la Península Ibérica), variedad de saltamontes que encuentra su habitat exclusivamente en las ciénagas de turba, pero con el objetivo de observar la repercusión del mercurio sobre sus cromosomas meióticos (Klasterka et al., 1978).

Otras especies utilizadas fueron: *Aedes albopictus* (mosquito) (no presente en la Península Ibérica) (Braekman et al, 1997 y 1998), *Blatella germanica* (cucaracha rubia) (Buquegneau et al., 1985; Ballan-dufrancais et al., 1978), *Apis mellifera* (abeja) (Toporcak et al., 1992) y, especialmente, *Drosophila melanogaster* (mosca del vinagre) (Osgood et al., 1991; Magnusson et al., 1986; Rasmuson, 1985; Sorsa et al., 1973; Ramel et al., 1979). Pero, como en el caso anterior, los estudios versaban primordialmente sobre las alteraciones genotóxicas y bioquímicas inducidas por el mercurio.

Al igual que en el caso de la experimentación botánica, no hemos encontrado en la bibliografía trabajos similares sobre mortalidad tóxica con los que contrastar nuestros resultados. Y ante la repercusión ecológica del abuso de pesticidas industriales, muchos de los cuales incorporan al medio ambiente metales pesados, ésta carencia resulta difícil de entender (Hempel et al., 1995)

En relación a la toxicidad mercurial sobre insectos, Toporcak (1992) determinó niveles de Hg en abejas que provenían de zonas contaminadas demostrando unos niveles tóxicos que se concentraban especialmente en el abdomen de los insectos (0.083 a 2.555 mg/K), con menores concentraciones en cabeza (0.029 a 0.385 mg/K) y tórax (0.028 a

0.595 mg/K). También demostró niveles elevados en la miel.

Mason et al. (2000) apreciaron que la distribución del metilmercurio en el cangrejo de río era uniforme en tanto que la de arsénico, selenio, cadmio y mercurio se verificaba en los órganos detoxicadores.

Braekman et al. (1997 y 1998) demostraron en el *Aedes albopictus* que las concentraciones intracelulares de los compuestos mercuriales se incrementaban linealmente con la concentración extracelular, con una acumulación de metilmercurio seis veces superior a la del mercurio. En tanto que el primero atravesaba la membrana celular reaccionando con las estructuras intracelulares, el mercurio se limitaba a actuar tóxicamente sobre la membrana. La principal vía de entrada del tóxico sería por difusión simple con la consecuente disrupción membranosa e inhibición de la proliferación celular que determinaría la muerte celular.

Bouquegneau et al. (1985) encontraron un mayor almacenamiento mercurial en el íleo de la *Blattella germanica* (cucaracha rubia), principalmente unido a la metalotioneína lo que sugiere que el mercurio de la fase insoluble se almacena en los lisosomas como una metalotioneína polimerizada. Ballan-Dufrançais obtuvo resultados similares.

El mantenimiento de chicharras (*Steropleurus stali*) en el laboratorio, fuera de su entorno natural es problemático, como demuestra que no hubo supervivencia en el grupo control tras dos semanas de cautividad, pese a haber intentado reproducir su biotopo.

Sin embargo, hemos demostrado que el tiempo de vida absoluto de la chicharra se asocia con la interacción de las distintas concentraciones y el sexo del insecto. Observando las significaciones de las diferencias con el grupo control (tabla 7.3) la significación no aparece hasta la concentración 250 ppm, haciéndolo súbitamente y con alta significación ($p < 0.02$). Ello nos sugiere cierto grado de resistencia al tóxico en las concentraciones inferiores. Este comportamiento se mantiene al analizar las diferencias ajustadas al sexo. Tras analizar las curvas de supervivencia a lo largo del tiempo de estudio, reafirmamos las diferencias totales significativas que aparecen entre las mortalidades de las diferentes concentraciones tóxicas y al comparar con el control, se establecen a partir del umbral establecido por concentraciones tóxicas de metilmercurio iguales o mayores de 250 ppm. Las curvas de supervivencia difieren también significativamente cuando se ajustan a las diferencias al sexo.

Analizando el impacto de los riesgos relativos se observa una tendencia a un comportamiento irregular ante el rango tóxico comprendido entre 1.95 ppm y 125 ppm. Es probable que con una "predación" científica que nos proporcionase un mayor tamaño de muestra de chicharras de la subpoblación, hubiéramos podido clarificar los riesgos de esas concentraciones con mayor exactitud. Pero sí confirmamos que, para cualquiera de los sexos, la concentración 250 ppm triplica significativamente el riesgo del grupo control y la 500 ppm lo quintuplica. Las diferencias establecidas anteriormente por sexos quedan reflejadas por una mayor sensibilidad al tóxico del macho que, ante cualquier concentración tóxica, acredita un impacto significativo de riesgo de mortalidad 1.61 veces superior. Una posible explicación podría ser debida al mayor desarrollo de los cuerpos grasos en las hembras que en los machos, teniendo en cuenta que los cuerpos grasos sirven como inmovilizadores de muchas sustancias tóxicas.

La excelente correlación inversa y cuadrática existente entre la concentración de metilmercurio y el tiempo medio de vida, nos permite definir a la chicharra como un excelente biomedidor del tóxico mediante la estimación del segundo parámetro.

El grillo (*Nemobius sylvestris*) por el contrario, sí se adapta mejor a la cautividad, con un 78.9% de la población del grupo control superviviendo a los 21 días de experimento. En él también se demuestra una afectación tóxica por el metilmercurio y muy parecida a la de la chicharra si bien la significación de las diferencias en el tiempo medio de vida absoluto comienza para concentraciones iguales o mayores de 300 ppm. Es de resaltar que las diferencias con el control de la concentración 250 ppm son quasi-significativas ($p < 0.10$). Por ello también consideramos que de un mayor tamaño de la muestra sometida a esta concentración, sería de esperar la confirmación estadística de su toxicidad.

Las peculiaridades diferenciales con la chicharra, a nivel de impacto del factor metilmercurio en el tiempo, se manifiestan con un comportamiento homogéneo de todas las concentraciones tóxicas como factores de riesgo ($RR_{aj} > 1$), si bien existen irregularidades en su grado de significación. Tal irregularidad desaparece claramente en el umbral establecido para concentraciones iguales o mayores de 250 ppm, con un riesgo casi diez veces superior al que acreditaba la chicharra y que llega a octocentuplicarse en presencia de 1000 ppm de metilmercurio. El análisis de las curvas de supervivencia en el tiempo corrobora asimismo el distinto comportamiento de las subpoblaciones en relación al control.

En el hecho de que, a dosis elevadas, la chicharra sea más resistente al tóxico que el grillo en tanto que a dosis bajas sea más sensible, pudieran intervenir factores biológicos y ambientales. Biológicamente las chicharras disponen de una mayor cantidad de cuerpos grasos que les permite adaptarse a las condiciones térmicas condicionadas por la la mayor altitud de su habitat y que podrían servirles, dada la afinidad lipídica del tóxico, como reservorio eficaz de almacenaje. Y desde el punto de vista medioambiental, se debe resaltar que, en tanto el habitat de la chicharra acredita la higiene que proporciona un suelo poblado de árboles de hoja perenne (pinos) y la altitud, el grillo tiene que desarrollar la excelente capacidad defensiva natural que le exige el hábito de vivir en contacto continuo entre un suelo de hojarasca procedente de árboles caducifolios (robles), rica en sustancias extrañas procedentes de la degradación de la hojarasca (putrefacción, etc.).

También el grillo, a través de una relación inversa y cuadrática de su tiempo medio de vida con las diferentes concentraciones tóxicas, acredita su capacidad biomedidora, si bien no tan excelente como la de la chicharra ($r^2 = 0.87$ versus 0.95 de la chicharra).

La comparación de los ejemplares de ambas especies que compartieron concentraciones tóxicas similares durante un tiempo común de dos semanas, permite tanto confirmar las peculiaridades ya comentadas como demostrar que ante cualquier concentración tóxica mercurial la chicharra es un bioindicador más sensible que el grillo al estar sometida a un riesgo ajustado y significativo de muerte 5.52 veces superior.

7.7. CONCLUSIONES

1.- Tanto la chicharra como el grillo se comportan, a través de su mortalidad, como bioindicadores significativos de la presencia de un metilmercurio que afecta tanto a su tiempo total de vida como a su tasa de mortalidad en el tiempo.

2.- La calidad bioindicadora de la chicharra ante el impacto tóxico es 5.52 veces superior a la del grillo, siendo, además, la de la chicharra macho 1.6 veces superior a la de la hembra.

3.- Ambas especies se comportan como biomedidores del impacto tóxico al correlacionarse, en modelo cuadrático, sus tasas de mortalidad con las diferentes concentraciones de metilmercurio, siendo esta capacidad mayor en la chicharra ($r^2 = 0.93$) que en el grillo ($r^2 = 0.87$)

7.8. REFERENCIAS

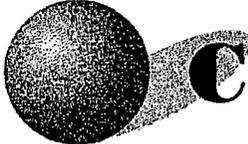
1. Ballan-Dufrançais C; Jeantet AY; Quintana C. [Methylmercury toxicity in insect: detection of mercury in lysosomes using electron microprobe]. C R Seances Acad Sci D 1979 Mar 5; 288 (9):847-9.
2. Bouquegneau JM; Ballan-Dufrançais C; Jeantet AY. Storage of Hg in the ileum of *Blatella germanica*: biochemical characterization of metallothionein. Comp Biochem Physiol C. 1985; (1): 95-8.
3. Braeckman B; Simoens C; Rzeznik U; Raes H. Effect of sublethal doses of cadmium, inorganic mercury and methylmercury on the cell morphology of an insect cell line (*Aedes albopictus*, C6/36). Cell Biol Int. 1977 Dec; 21 (12): 823-32.
4. Braeckman B; Cornelis R; Rzeznik U; Raes H. Uptake on HgCl₂ and MeHgCl in an insect cell line (*Aedes albopictus*, C6/36). Environ Res. 1998 Oct; 79 (1): 33-40.
5. Braeckman B; Raes H; Van Hoye D. Heavy-metal toxicity in an insect cell line. Effects of cadmium chloride, mercuric chloride and methylmercuric chloride on cell viability and proliferation in *Aedes albopictus* cell. Cell Biol Toxicol. 1997 Oct; 13(6): 389-97.
6. Burgos Ramírez L; Herrera Mesa L. In: Los Ortopteros de la Rioja. Ediciones Instituto de Estudios Riojanos. Logroño. 1986.
7. Bolívar I. Sinopsis de los Ortópteros de España y Portugal. An. Soc.Española Hist. Nat., Madrid. 1877; 5: 249-348.
8. Bolívar I. Sinopsis de los Ortópteros de España y Portugal. An. Soc. Española Hist. Nat., Madrid. 1876-1878; 333 págs.
9. Dumortier B. Morphology of sound emission apparatus in Arthropoda. In: Busnel, RG. 1963^a; 277-345.
10. Dumortier B. Ethological and physiological study of sound emission in Arthropoda. In: Busnel, RG. 1963^b; 583-654.
11. Chinery M. Guía de campo de los Insectos de España y Europa. Ed. Omega, Barcelona. 1977; 402 pp.
12. Fulton BB. Stridulating organs of female Tettigoniidae (Orthoptera). Ent. News, 1933; 44: 108-

128.

13. Hare L. Aquatic insect and trace metals: bioavailability, bioaccumulation, and toxicity. *Crit Rev Toxicol.* 1992; 22(5-6): 327-69.
14. Hartley JC; Robinson DJ & Warne AC. Female response song in the Ephemeroptera *Steropleurus stali* and *P. obvius* (Orthoptera, Tettigoniidae). *Animal Behaviour*; 1974; 22: 382-389.
15. Hartley JC. Acoustic behaviour and phonotaxis in the duetting ephippigerines, *Steropleurus nobrei* and *Steropleurus stali* (Tettigoniidae). *Zoological journal of the Linnean Society*. 1993; 107: 155-167.
16. Heller,KG.; Korsunovskaya O; Ragge DR.; Vedenina V; Willense F; Zhantiev RD and Frantsevich L. Check-List of European Orthoptera. *Articulata-BEIHEFT* 7. 1998; 1-61.
17. Hempel M; Chau YK; Dutka BJ; McInnis R; Kwan KK; Liu D. Toxicity of organomercury compounds: bioassay results as a basis for risk assessment. *Analyst*. 1995 Mar; 120 (3): 721-24.
18. Klasterka I; Ramel C. The effect of methyl mercury hydroxide on meiotic chromosomes of the grasshopper *Stethophyma grossum*. *Hereditas*. 1978; 88 (2): 255-62.
19. Magnusson J; Ramel C. Genetic variation in the susceptibility to mercury and other metal compounds in *Drosophyla melanogaster*. *Teratog Carcinog Mutragen* 1986; 6 (4): 289-305.
20. Mason RP; Laporte J; Andres S. Factors controlling the bioaccumulation of mercury, methylmercury, arsenic, selenium and cadmium by freshwater invertebrates and fish. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2000 Apr; 38 (3): 283-97.
21. Osgood C; Zimmering S; Mason JM. Aneuploidy in *Drosophyla*, II. Further validation of the FIX and ZESTE genetic test systems employing female *Drosophyla melanogaster*. *Mutat Tes*. 1991 Feb; 259 (2): 147-63.
22. Pardo E; Gómez R y del Cerro A. Orthopteroidea de los sistemas montañosos de Castilla-La Mancha (España). II. *Ensifera. Zool. baetica*. 1993. 4: 113- 148.
23. Peinado MV. Inventario preliminar de los Ephemeroptera paleárticos. Géneros *Steropleurus* Bol. y *Uromenus* Bol. (Orthoptera, Tettigoniidae). *Bolm. Soc. port. Ent*. 1990; 123 (IV-21):257-276.
24. Peinado MV; Mateos J; Arahetes RM. Contribución al estudio del comportamiento acústico de Orthoptera Ensifera: índice de actividad sonora de *Steropleurus stali*. *Com. 5º Congr. Int. Soc.*

Port. Entomología. 1987; pp. 178.

25. Peinado MV. Tettigonioideos españoles (Ephippigerinae). Tesis doctoral. 1990.
26. Pardo González JE. Estudio faunístico y ecológico del superorden Orthopteroidea de los principales sistemas montañosos de Castilla La Mancha. Tesis Doctoral. 1992.
27. Ragge DR. Grasshopper, crickets and Cockroaches of the British Isles XII, XXII pl. Fiederich Warne, London. 1965a; 299pp.
28. Ragge DR. Ortópteros y Dermápteros colectados en la Península Ibérica durante los años 1962-1963 por misiones del British Museum (Natural History). *Graellsia*. 1965b; 21: 95-117.
29. Ramel C; Magnusson J. Chemical induction of nondisjunction in drosophila. *Environ Health Perspect*. 1979 Aug; 31: 59-66.
30. Rasmuson A. Mutagenic effects of some Water-soluble metal compounds in a somatic eye-color test, system in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*. 1985 Aug-Sep; 157 (2-3): 157-62.
31. Reichholf-Riehm H. Insectos y arácnidos. Guías de Naturaleza Blume. Ed. Blume. Barcelona. 1986. pp 56.
32. Ross HH. Introducción a la ENTOMOLOGÍA General y Aplicada. Ed. Omega S.A. Barcelona. 1973.
33. Sorsa M; Pfeifer S. Response of puffing pattern to in vivo treatments with organomercurials in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas* 1973; 40: 125-60.
34. Spooner, J.D. Pair-forming acoustic systems of pheneropterine katydis (Orthoptera: Tettigoniidae) *Anim. Behav.* 1968; 15: 197-212.
35. Toporcak J; Legath J; Kul'kova J. [Levels of mercury in samples of bees and honey from areas with and without industrial contamination]. *Vet Med (Praha)*. 1992 Jul; 37 (7): 405-12.



CAPÍTULO 8

8.SINTESIS Y CONCLUSIONES GENERALES

8.1.SÍNTESIS

La inquietud por la preservación de un medio ambiente compatible con el imprescindible desarrollo tecnológico ha motivado la realización de este trabajo, finalizado con el apoyo humano y técnico del Instituto Universitario de Ciencias Ambientales (IUCA) y los Dpt^{os} de Nutrición y Bromatología y de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la UCM.

El impacto destructivo ecológico consecuente a la llegada de una revolución industrial que generó un sobreconsumo y malgasto de la producción, ha determinado un incremento preocupante de la bioconcentración de tóxicos antropogénicos medioambientales, rompiendo sus propios ciclos biogeoquímicos, sostenibles y asumibles en función de su naturalidad. Entre los tóxicos metálicos destacan los mercuriales, especialmente el metilmercurio, cuya toxicidad es objeto del presente estudio.

Se entiende por **bioindicador**, aquél organismo utilizable para el control de los factores ambientales o para el estudio de los niveles y tipo de contaminación. Complementaría esta definición la propiedad de que su existencia, características estructurales, funcionamiento y reacción dependen del medio en el que se desarrollan, cambiando al modificarse las condiciones medioambientales (Capó, 1998).

El uso de bioindicadores supone una solución alternativa al empleo de sistemas de biomonitorización de tipo mecánico, inalcanzables, por complejidad y coste, para muchos países. Asimismo, abren un campo interesante y actualizado de investigación, abordable para el licenciado que intenta rematar dignamente su formación académica, exponiendo a juicio su capacidad de extraer rendimiento de los medios de trabajo a su alcance, aún siendo menguados.

Para el estudio de la potencialidad bioindicadora de especies en la toxicidad del MeHg y fundamentándonos en los criterios APHA (1983), hemos realizado un bioensayo sobre una muestra 9732 bioelementos animales y vegetales, seleccionados por su esperable sensibilidad, amplitud de distribución y disponibilidad, y aptitud para el trabajo de laboratorio.

En el aspecto bioético hemos complementado estos criterios con la premisa de no estar catalogadas las especies como protegidas y, en el del interés cercano, eligiendo el biotopo de la CAM y escogiendo aquellas en íntima relación con la pirámide trófica, de relevancia nutricional veterinaria y humana y de interés autonómico agrícola, piscícola y ganadero.

Por la concurrencia de diferentes especies y metodologías se ha optado por una presentación en formato de capítulos específicos.

En el capítulo 1, junto a las consideraciones generales, se exponen objetivos, planteamiento y justificación. Los objetivos diana han sido:

1. Revisión y actualización bibliográfica del material biológico a experimentar y del MeHg.
2. Diseño de una tecnología adecuada para la realización del experimento.
3. Utilización de animales y plantas autóctonos para establecer su potencialidad ecotoxicológica bioindicadora y/o biomedidora.
4. Creación de una base de datos que integre toda la información recogida a lo largo del proyecto sobre la que aplicar posteriormente la metodología bioestadística, determinando el grado de fiabilidad de los parámetros aplicados en la detección medioambiental del efecto tóxico.
5. Establecimiento, en caso positivo, de las calidades de bioindicación y biomedición de las muestras empleadas.

El diseño se ha enfocado fundamentándolo en el ciclo del agua (Fig. 2.2), monitorizando posibles bioindicadores acuáticos y terrestres representativos de cuatro cotas de la Sierra de Guadarrama (Fig. 1.1), por la capacidad reservoria y motora del elemento sobre un tóxico que afecta peligrosamente a la calidad de las aguas y por tanto a los ecosistemas. El MeHg se dispersa ampliamente en las aguas continentales, llegando vehiculizado por escorrentía y curso fluvial a los estuarios, contaminando el ciclo hídrico y subsecuentemente la pirámide trófica. Su detección precoz podría evitar desastres como

el paradigmático de Minnamata (1953), motivo más que suficiente para justificar este trabajo que, en el seno del ciclo hídrico, aborda exclusivamente la perspectiva del agua continental.

Los aspectos ecotoxicológicos del Hg conforman el capítulo 2 con una introducción histórica y actualización bibliográfica, datando la referencia más antigua, de la literatura británica del siglo XVII (Woodall, 1639). Tras recoger, brevemente, las catalogaciones jurídicas del tóxico se revisan los envenenamientos más relevantes desde el de Minnamata (1953), por consumo de pescados y mariscos contaminados, hasta el reciente deterioro medioambiental de la Amazonía por la extracción aurífera. Se exponen las propiedades fisicoquímicas del metal para detallar seguidamente el trascendental ciclo global del mercurio (Fig. 2.1), que se biomagnifica en la cadena alimentaria en función de unas características tóxico-cinéticas y tóxicodinámicas inductoras de lesiones fundamentalmente neurológicas en humanos y animales, y que se detallan. Se presentan los modelos compartimentales del mercurio y metilmercurio en relación al ciclo global del agua (Fig. 2.2) y el específico del ecosistema acuático (Figs. 2.3 y 2.4).

El capítulo 3 conceptúa, tipifica, sopesa y especifica los ítems terminológicos relacionados con la **bioindicación** y sus aplicaciones experimentales. Se admiten internacionalmente categorizaciones por grado de sensibilidad, forma de respuesta al estímulo y posibilidades para la medición. Son de gran interés las estratificaciones de los agentes **biomonitores** por su grado de capacidad de cuantificación de los niveles de contaminación medioambiental que permitirían, incluso mediante trabajo de campo, no sólo la detección biosensora, sino también una estimación científica, indirecta y práctica de tales niveles.

Se completa el capítulo con un listado de los invertebrados más utilizados en las pruebas medioambientales en función de las recomendaciones de los distintos organismos internacionales. Las guías de conducta para la cuantificación, las metodologías disponibles y una revisión sobre procesos de ecosistemas, dan paso a una síntesis de los posibles bioensayos ecotoxicológicos disponibles en el intento de colaborar a la consecución de un desarrollo biológico sostenible y compatible con el progreso.

El capítulo 4, detalla el tratamiento global metodológico de la información. Para el soporte bibliográfico se han utilizado, como herramientas de búsqueda, los sistemas Medline, Vet-CD e Internet complementados con entrevistas personales a

expertos académicos o profesionales del tema, en demanda de mayor información, en los Centros oficiales que se detallan, consultándose además la mayoría de sus bibliotecas.

Desde la humildad, y tras un muy laborioso trabajo de búsqueda, queremos resaltar que, quizá por la sencillez de diseño impuesta por nuestros limitados medios, sorprende no encontrar en la literatura, hasta donde llega nuestro conocimiento, diseños experimentales similares con los que contrastar los resultados. Esto ha sido uno de los motivos para diseñar el trabajo de forma que permitiera la aplicación de los estadísticos más exigentes y actuales, que fueron realizados mediante el paquete Statistical Package for Psychosocial Sciences (SPSS) para Windows complementado con una macro accesoria.

Se han aplicado, según las características de las variables: análisis de varianza para uno o dos factores de Fisher con test de Levene y análisis "post-hoc" de Tahmane, test t-no pareado de Student con o sin corrección de Welch, y estadísticos asociativos chi-cuadrado de Pearson con posibilidad de corrección de Yates y exacto de Fisher. El ajuste a la normalidad de las variables se estimó mediante el test de Kolmogorov- Smirnov y el análisis de supervivencia en el tiempo mediante el estadístico Kaplan-Meier con comparaciones pareadas de Breslow.

El análisis del impacto de los factores de bioriesgo se ha realizado mediante la determinación de odds-ratios crudos (OR) o ajustados por regresión logística (OR_{aj}) con método por máxima verosimilitud y puntuación eficiente de Rao o por riesgos relativos ajustados (RR_{aj}) obtenidos mediante la técnica de regresión de riesgos proporcionados de Cox. Se han construido modelos predictivos estimándose su poder mediante matrices de clasificación, construcción de curvas de rendimiento diagnóstico (ROC) y determinación del área bajo ella (w). La capacidad biomedidora se evaluó por regresión lineal simple o múltiple de pasos sucesivos (stepwise), mediante el coeficiente de determinación (r^2) y mejor ajuste de los modelos de regresión a las diferentes curvas.

Se estableció un intervalo de confianza del 95% para todo el estudio y las pruebas se realizaron para significación de dos colas.

Todos los dibujos y fotografías, salvo los que muestran referencia específica de autor, son originales. Se han manejado los programas Microsoft Word, Power Point, Corel Draw, CorelPaint, Videokit y Thumbplus 3.0 para Windows.

Los capítulos experimentales disponen de metodología específica y el total de referencias bibliográficas es de 202 citas.

El capítulo 5, inicia la parte experimental correspondiente a los potenciales bioindicadores vegetales de leguminosas y gramíneas, considerando los factores que intervienen en la germinación de las semillas y posterior crecimiento de las plantas, con especial referencia a los inherentes a los metales pesados (Fig. 5.1). Siguiendo las recomendaciones de Rybeire (1994), se realizaron pruebas piloto de substratos optándose por la sepiolita. En ella se siembran **2123** semillas distribuidas de la siguiente forma: 465 de *Hordeum vulgare* (cebada), 438 de *Zea mays* (maíz), 1000 de *Lens culinaris* (lentejas) y 220 de *Vicia faba* (habas) que fueron agrupadas, por especies, en un grupo control regado con agua y otros nueve que recibieron un riego único con soluciones en razón exponencial de metilmercurio en un rango de concentración de 1.95 a 500 ppm. Las cosechas fueron contadas y medidas a partir del séptimo día de iniciarse la germinación y el número de plantas medidas fue de **1506**.

Se analizaron por especies las variables diana porcentaje de inhibición germinativa ("no.germinación" = NG) y desarrollo en altura de la planta (A). En la estimación individual, se ha demostrado una afectación muy significativa por el MeHg tanto de las gramíneas como de las leguminosas evidenciada por una magnificación de la inhibición germinativa y una reducción del desarrollo de la planta.

Se demuestran correlaciones muy significativas que son, excelente y directa entre las concentraciones tóxicas y la NG ($r^2 > 0.9$), e indirecta y buena ($r^2 > 0.67$) entre concentraciones y altura de la planta en los diferentes ajustes curvilíneos obtenidos. En la evaluación conjunta, se obtiene el siguiente modelo predictivo logístico de inhibición germinativa cuyos coeficientes beta de regresión muestra la tabla 5.XXIII.

$$(Pr_{\text{no-germinación}}) = \left[1 / (1 + e^{-[-4.194 + \beta 1 (\text{Bioindicador (si = 1;no = 0)} + \beta 2 (\text{Concentración MeHg (si = 1;no = 0)})])} \right]$$

(-2LL = 1446.6; bondad de ajuste = 2326.7; gl = 12; χ^2 del modelo = 1112.4; p < 0.001)

Todas las concentraciones tóxicas, se comportaron como factores de riesgo ($OR_{aj} > 1$), si bien las significaciones estadísticas de los riesgos ajustados aparecieron en la concentración 7.81ppm ($OR_{aj} = 2.766$), creciendo con tendencia exponencial hasta la concentración 500 ppm ($OR_{aj} = 442.7$). El área bajo la curva ROC fue de 0.89 ± 0.01 (Fig. 5.26) y la eficacia del modelo del 88%.

Se demuestra que el maíz, aunque afectado en su germinación por el MeHg, es el bioindicador menos sensible, mientras que las restantes especies acreditan una mayor y significativa sensibilidad al tóxico (lenteja 1.6 veces, haba 2 veces y cebada 8.05 veces superioral maíz).

Si bien las cuatro especies acreditaron su capacidad biomedidora a través del desarrollo de las plantas, el maíz fue seleccionado, en el proceso de regresión lineal múltiple paso a paso, como mejor predictor cuantitativo de la afectación tóxica ($r^2 = 0.97$; $p < 0.001$) en ajuste curvilíneo cuadrático.

En la evaluación de artrópodos, el capítulo 6 describe el bioensayo realizado con el zooplancton del embalse de Valmayor de la CAM, compuesto por las especies que se fotografian y esquematizan en las figuras iniciales del capítulo (Daphnia, Bosmina, Chydorus y Cyclops), en el que se estudió la mortalidad y la posible afectación de la capacidad fototóxica.

En un acuario de 32 litros de capacidad, se reprodujo su entorno natural a base de agua del pantano de Valmayor, piedras y algas verdes del propio pantano. La intoxicación se realizó con concentraciones exponenciales crecientes de metilmercurio en un rango de 0.007-32 ppm, para contraste con grupos control. Para el estudio de la fototaxia, se diseñó y fabricó especialmente una cámara de separación fototóxica que muestran las Figs. 6.10, 6.11, 6.12, 6.13 y 6.14. La visualización para conteo se realizó con una lupa Askania. El estudio de asociación se realizó mediante la creación de tablas de contingencia y estadísticos chi- cuadrado y exacto de Fisher, en función del número de elementos de las casillas de las tablas de contingencia, con la corrección de Bonferroni. Se contaron **7231** ejemplares.

Se demuestra que el metilmercurio aumenta muy significativamente la mortalidad del zooplancton ($p < 0.001$), correlacionándose los porcentajes de mortalidad directa y significativamente con las concentraciones del tóxico y obteniéndose el mejor

ajuste mediante una curva cúbica ($r^2 = 0.98$; $p < 0.001$). Igualmente se demuestra que el tóxico reduce la capacidad fototóxica en relación al grupo control a partir de la concentración 0.062 ppm ($p < 0.001$). Asimismo, se observó una correlación inversa y significativa entre los porcentajes de mortalidad y de capacidad fototóxica ($r^2 = 0.61$; $p = 0.02$) que abre una línea de investigación en orden a establecer si es debida a una afectación tóxica neurológica con disminución de la sensibilidad a la luz y alteración de la coordinación motora o por afectación muscular primaria o por interacción de ambas.

El capítulo 7 expone la experimentación realizada con los artrópodos terrestres *Steropleurus Stali* (chicharra) y *Nemobius Sylvestris* (grillo) capturadas en los Puertos de Rascafría y La Morcuera de la CAM. Se construyó el insectario cuyo diseño muestran las fig. 7.10 y 7.10b. El estudio se realiza sobre una población de 377 ortópteros, 148 chicharras (32 machos y 116 hembras) y 229 grillos distribuidas ambas en un subgrupo control y nueve subgrupos objeto de intoxicación. El tóxico fue liberado por un difusor celulósico estandarizado impregnado en 5 ml. de diferentes concentraciones de metilmercurio: nueve, para las chicharras (rango 1.95 – 500 ppm) y dieciocho, para los grillos (rango 1.95 – 1000 ppm). Se realizó un estudio de supervivencia en un tiempo de 21 días para los grillos y 14 para las chicharras mediante el estadístico Kaplan-Meier con test estratificado de Breslow, finalizado el cual se liberó a los controles supervivientes.

Se demuestra que el metilmercurio reduce significativamente el tiempo de vida de la chicharra ($p = 0.01$), existiendo, además, diferencias en el tiempo de vida por sexos ($p < 0.001$). Las curvas de mortalidad en el tiempo para las diferentes concentraciones tóxicas también difirieron significativamente ($p < 0.001$), manteniéndose las diferencias en la estratificación por sexo (Fig 7.12). En las comparaciones pareadas se observaron diferencias significativas en concentraciones iguales o mayores de 250 ppm. La regresión de Cox confirmó un riesgo relativo ajustado (RR_{aj}) 3.15 veces mayor para dicha concentración (IC 95% = 1.37 – 7.28), así como una sensibilidad al tóxico 1.61 veces superior en el macho (IC 95% = 1.01 – 2.54) (Tabla 7.VIII). También se demuestra una correlación inversa y muy significativa ($r^2 = 0.87$; $p < 0.001$) entre concentraciones tóxicas y tiempo de vida del animal en el ajuste curvilíneo cuadrático (Fig. 7.13).

El metilmercurio también afectó y aún con mayor significación a la supervivencia del grillo ($p < 0.001$) (Figs. 7.15 y 7.16), comportándose las dieciocho concentraciones tóxicas utilizadas en este caso concreto como factores de bioriesgo (RR_{aj}

> 1) (Tabla 7.X) correlacionándose a su vez inversa y muy significativamente con el tiempo de vida en el ajuste cuadrático ($r^2 = 0.87$; $p < 0.001$) (Fig 7.17).

Se estableció un punto de corte de 14 días para estudiar comparativamente los ortópteros sometidos al efecto de las nueve concentraciones tóxicas comunes similares. La población comprendió un total de 277 elementos: 148 grillos (53.4%) y 129 chicharras (46.6%). Las curvas de supervivencia fueron significativas tanto las totales como en las estratificaciones pareadas ($p = 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente) (Fig. 7.19 y 7.20). Advirtiendo de un posible sesgo que impondría la distinta longevidad de ambas especies, se apreció el comportamiento como factores de bioriesgo de todas las concentraciones tóxicas utilizadas ($RR_{aj} > 1$), apareciendo significación a partir de concentraciones ≥ 250 ppm y acreditando la chicharra mas resistencia al tóxico que el grillo ($RR_{aj} = 0.17$; IC 95% = 3.95 – 7.71) (Tabla 7. XIII).

8.2. CONCLUSIONES FINALES

Sobre la síntesis de las conclusiones parciales que se detallan en cada capítulo experimental se concluye finalmente:

1. Todos los organismos utilizados en este trabajo poseen **capacidad bioindicadora significativa** del impacto tóxico del metilmercurio.
2. Cumplen los requisitos preconizados por Luque (1997) al proporcionar respuestas de interés para el ecosistema a analizar, de fácil observación y/o medición, ser de sencillo muestreo y existir suficiente población como para no depredarla, y son aptos para ser utilizados en **pruebas de bioensayo**, ya que reúnen todas las condiciones APHA exigibles, descritas en el capítulo 3 (Moriarty, 1983).
3. El metilmercurio, en el contraste con los controles, produce un descenso significativo en las poblaciones de artrópodos terrestres ($p < 0.001$) y acuáticos ($p < 0.001$), una reducción significativa en la tasa de germinación y altura de las plantas ($p < 0.001$) y afecta negativa y significativamente a la capacidad fototóxica del zooplancton ($p < 0.03$).

4. Todas las especies se comportaron como agentes **biomonitores** naturales y de reacción manifiesta. Esta característica se manifiesta a través de una excelente **capacidad biomedidora** del tóxico, demostrada mediante las variables analizadas a excepción de la fototaxia del zooplancton.
5. El comportamiento biomedidor es estadísticamente **predecible** con alto grado de fiabilidad con unos rangos para los coeficientes de determinación (r^2) entre 0.67 y 0.90 y entre 0.89 y 0.90 para las áreas bajo las curvas de rendimiento diagnóstico (W_{ROC}).
6. Se pueden considerar agentes **biosensores**, ya que todos son organismos vivos que manifiestan el impacto tóxico del metilmercurio de forma cuantificable e incluso predecible como se demuestra por los estudios de correlación, odds-ratio, riesgos relativos ajustados y curva ROC.
7. La **tecnología diseñada** y aplicada específicamente para este trabajo, es plenamente viable y aplicable en el laboratorio para el estudio y control del biorriesgo por polutantes o contaminantes permitiendo, además, la apertura de futuras y novedosas líneas de investigación medioambiental rentables científica, económica y bioéticamente.
8. Los resultados, aplicados a una protección medioambiental y a la ayuda en la consecución de un desarrollo sostenible, serían utilizables para el control mercurial de vertidos, aguas de riego y emisiones. El zooplancton, para la monitorización mercurial bromatológica y piscícola de las aguas continentales; las gramíneas y leguminosas en explotaciones agrícolas y ganaderas y los artrópodos terrestres para la monitorización de los pastos naturales de la alta y media montaña.

8.3. REFERENCIAS

1. Capó MA; Borregón S; Peribáñez E; Jover A y Palencia M. Uso de bioindicadores, prevención y cuantificación experimental de procesos ecotoxicos. *Ciencias Veterinarias*. 1998 Mayo; pp. 47-56.
2. Luque MD. Biosensores en el seguimiento de la contaminación ambiental: ¿Panacea o fraude?. *Técnicas de LABORATORIO*. 1997; 219 (3): 122-124.
3. Moriarty F. *Ecotoxicology*. Ed. Academic Press. London, 1983.
4. Ribeyre F; Boudou A. Experimental study of inorganic methylmercury bioaccumulation by four species os freshwater rooted macrophytes from water and sediment. *Ecotoxicol Environ Saf* 1994 Aug; 28 (3): 270-86.
5. Woodall J. *The Surgeon's or mimitary & domestic surgery*. London, 1639; 256 pp.



BIBLIOTECA