



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

EFFECTO DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE PETRÓLEO SOBRE EL CRECIMIENTO  
Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE *Daphnia magna* (Crustácea: Daphniidae)  
Strauss, 1820  
(Modalidad: Tesis de Grado)

LOURMARYTZ DEL VALLE MÁRQUEZ SUBERO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CUMANÁ, 2021

EFFECTO DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE PETRÓLEO SOBRE EL CRECIMIENTO  
Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE *Daphnia magna* (Crustácea: Daphniidae)  
Strauss, 1820

APROBADO POR:



---

Profa. Dialys Bastardo  
Asesora



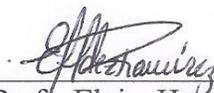
---

Prof. Jesús Bello  
Coasesor



---

Prof. Luis Freites  
Jurado



---

Profa. Elvira Hernández  
Jurado

# ÍNDICE

DEDICATORIA .....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
LISTA DE TABLAS .....	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
RESUMEN .....	V
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	6
1.- Cultivo de los organismos .....	6
2.- Preparación de la fracción acuosa de petróleo .....	6
3.- Concentración letal media (LC <sub>50</sub> ) de la fracción acuosa del petróleo .....	6
4.- Bioensayo .....	7
5.- Crecimiento de <i>Daphnia magna</i> .....	7
6.- Parámetros de crecimiento .....	7
6.1.- Supervivencia o porcentaje de mortalidad .....	7
6.2.- Edad de la primera reproducción .....	7
6.3.- Total de progenie.....	8
6.4.- Producción de huevos epífiros.....	8
7.- Composición bioquímica.....	8
7.1.- Proteínas totales.....	8
7.2.- Carbohidratos totales.....	9
7.3.- Lípidos totales .....	10
8.- Análisis estadísticos .....	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	12
Concentración letal media (LC <sub>50</sub> ) de la fracción acuosa del petróleo .....	12
Parámetros de crecimiento.....	12
Edad de la primera reproducción, progenie total y producción de huevos epífiros .....	12
Supervivencia .....	15
Composición bioquímica .....	16
CONCLUSIONES .....	19

RECOMENDACIONES.....	20
BIBLIOGRAFÍA .....	21
HOJA DE METADATOS .....	28

## **DEDICATORIA**

A mi amado Dios, por ser aquel por quien tuve la fortaleza para seguir adelante en un camino que más que talento, requiere perseverancia. Es por ti por quien he llegado hasta aquí. Gracias por guiarme a las piezas clave y conexiones idóneas en este transitar. Te debo todo.

## AGRADECIMIENTOS

A mi amado Señor Jesucristo. Gracias por siempre estar a mi lado.

A mis padres Rosa Subero y Rafael Márquez, por siempre creer en mí y apoyarme en todo. Soy afortunada por tenerlos.

A mi hermana Roanma Martínez, sobrinos: Gabriela Maza, Cinthya Maza y Gabriel Mathias Maza y a Marlene Romero por impulsarme a seguir adelante. Los amo.

A la profesora Roraysi Cortez. No habría podido tener mejor asesora, gracias por su paciencia, por su guía en este camino, por ser una luz en momentos de oscuridad, gracias por su sabiduría, consejos y amistad. Gracias por ser ejemplo y dejar ver en usted el reflejo de quien verdaderamente ama lo que hace.

Al profesor Miguel Guevara, por sus conocimientos, cariño y por la disposición a ayudarme siempre. Es por usted por quien tuve la dicha de conocer a Rora. Estoy en deuda.

A mis nuevos asesores Dialys Bastardo y Jesús Bello por aceptar el reto y ser uno conmigo. ¡Gracias!

A María Rivas, por siempre mostrarme su cariño y estar al pendiente de mí. Mil gracias.

A la profesora Bertha Velásquez, por ser un instrumento cuando fue necesario para el alcance del triunfo que disfruto hoy.

A todas las personas que forman parte del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas de la Universidad de Oriente, por brindarme su amistad, complicidad y apoyo. No podría haber llegado a mejor lugar.

A los compañeros de estudio que me acompañaron en este camino e hicieron de él un agradable transitar.

A la Universidad de Oriente.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Análisis Probit de la LC <sub>50</sub> .....	12
Tabla 2. Porcentaje de supervivencia de <i>Daphnia magna</i> sometida a 0% (control) y 5% de FAP durante 20 días de cultivo.....	15

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Edad de la primera reproducción (días) de *Daphnia magna* sometida a 0 % (control) y 5% de FAP. .... 13
- Figura 2. Progenie de *Daphnia magna* (Núm neonatos/día) sometida a 0% (control) y 5% de FAP durante 20 días de cultivo. .... 14
- Figura 3. Contenido bioquímico (proteínas, carbohidratos, lípidos) de *Daphnia magna* expuesta a diferentes concentraciones de fracción acuosa de petróleo. .... 17

## RESUMEN

Este estudio utilizó una cepa de *Daphnia magna* con el fin de evaluar los efectos de la fracción acuosa del petróleo (FAP) sobre la misma. La FAP se preparó mezclando agua destilada estéril y petróleo crudo en proporción 9:1, a partir de la cual se realizaron ensayos para calcular la LC<sub>50</sub>, exponiendo 10 neonatos de *D. magna* (de la misma cohorte) por triplicado a determinadas concentraciones del xenobiótico (0 (control); 0,5; 1; 5; 10; 25; 50; 75 y 100%), sin recambio de agua ni alimentación. Una vez determinada la LC<sub>50</sub> se procedió a la realización del bioensayo, usando la concentración seleccionada para evaluar los parámetros de crecimiento: supervivencia, edad de la primera reproducción, total de progenie, producción de huevos epífios; así como la composición bioquímica de los organismos. Los resultados de la LC<sub>50</sub> arrojaron una toxicidad aguda relativamente baja (5%), la cual afectó la edad de la primera reproducción, disminuyendo la producción de neonatos en los organismos expuestos a la FAP a 5 días, mientras que en el control fue de 7 días. Las daphnias expuestas a 5% de FAP presentaron mayor progenie total ( $467,67 \pm 8,31$  dáfidos); en tanto, la supervivencia fue mayor en el control (93,33%). Cabe destacar que los dáfidos de ambos tratamientos no produjeron huevos epífios. El contenido de carbohidratos fue significativamente mayor en los cladóceros expuestos a la FAP ( $55,44 \pm 10,99\%$ ), mientras que los mayores contenidos de proteínas ( $27,83 \pm 3,24\%$ ) y de lípidos ( $1,1 \pm 0,002\%$ ) lo presentaron las daphnias del tratamiento control. Los resultados muestran que la FAP afecta de manera importante el crecimiento, supervivencia, reproducción y las reservas energéticas de *D. magna*. Estos resultados sumados a su fácil cultivo, reproducción, mantenimiento y su posición en la cadena alimentaria, la convierten en una especie modelo para estudios de contaminación por hidrocarburos, en ambientes acuáticos.

Palabras clave: toxicidad, petróleo, *Daphnia magna*, crecimiento, bioquímica.

## INTRODUCCIÓN

La descarga de sustancias tóxicas en los ecosistemas acuáticos produce una variedad de respuestas complejas en los organismos que requieren ser evaluadas. Para tal fin, son implementadas las pruebas y bioensayos de toxicidad (Silva *et al.*, 2007). Las pruebas de toxicidad permiten evaluar el grado de afectación que una sustancia química tiene en organismos vivos (Jaramillo *et al.*, 2009), en tanto, los bioensayos de toxicidad son técnicas de evaluación de los efectos tóxicos agudos o crónicos, tanto de sustancias químicas conocidas como de muestras ambientales de composición incierta (Larrain, 1995). La toxicidad en los organismos incluye efectos letales tanto a largo como a corto plazo, y efectos subletales, como cambios en el crecimiento, desarrollo, reproducción y comportamiento. Los efectos tóxicos agudos son los que ocurren rápidamente, como resultado de una exposición a corto plazo, generalmente son severos o mortales. El efecto tóxico crónico puede ocurrir cuando hay exposiciones repetidas o en un largo periodo de tiempo, al producto químico (Rand, 1995).

Las pruebas de toxicidad son conducidas en varios espacios de tiempo, siendo 96 h la prueba más común. Normalmente el organismo se expone a altas concentraciones de un agente tóxico con la finalidad de determinar los cambios producidos, lo que se evidencia con la muerte como criterio de respuesta (Sánchez y Vera, 2001). A partir de tal información es posible determinar la concentración letal media (LC<sub>50</sub>), definida como la concentración derivada de un tóxico que causará la muerte del 50% de los organismos expuestos a dicha sustancia durante un período determinado (Lesme *et al.*, 2015).

En los ecosistemas acuáticos los contaminantes que causan el mayor daño se clasifican en dos grupos principales: el primero comprendido por sustancias presentes en los efluentes producidos por los grandes centros urbanos, especialmente aquellos asociados con el vertido inadecuado de residuos. El segundo grupo, compuesto por contaminantes de la industria y la minería, que incluye sustancias tóxicas como metales, gases de efecto invernadero y contaminantes orgánicos como el petróleo (Drude y Malm, 2008).

Los efectos de toxicidad por petróleo, en varios elementos del ecosistema, han

incrementado desde 1960 (McCauley, 1966; Baker, 2001; Peterson *et al.*, 2003), debido a que en su mayoría, principalmente lo componen hidrocarburos alifáticos y aromáticos que pueden ser categorizados como parafinas (alquenos), olefinas (alcanos), naftenos (cicloalquenos) y aromáticos (monocíclicos y policíclicos) (Watts, 1998). Singer *et al.* (2000) señalan que el petróleo crudo es la mezcla más compleja y variable para evaluar toxicológicamente porque contiene miles de compuestos en concentraciones que son a menudo difíciles de determinar. Además de las características variables de los diferentes crudos, los muchos componentes del petróleo pueden tener propiedades fisicoquímicas muy diversas, que a su vez tienen implicaciones para su comportamiento ambiental, destino y efectos (Lee *et al.*, 2015; NASEM, 2016).

Algunos componentes del petróleo particularmente solubles en agua, mantienen bajas sus concentraciones en los ambientes acuáticos (Mekenyan *et al.*, 1994), por lo que la mayoría de las investigaciones toxicológicas con petróleo crudo se han centrado en la fracción soluble en agua, ya que es la parte que entra en un sistema acuático con suma facilidad y que puede infringir daño inmediato en los organismos acuáticos. El resto de los componentes, por su parte, terminan siendo incorporados en la columna de agua a través de otros mecanismos tales como la adsorción en sólidos y sedimentos en suspensión (Hodge *et al.*, 1993; Bennet *et al.*, 1999; Martinez-Jeronimo *et al.*, 2005; Navas *et al.*, 2006; Adeniji *et al.*, 2017).

Los estudios sobre el destino y efectos del petróleo que entran al ambiente acuático se han concentrado en los sistemas marinos, dado que gran parte de los grandes derrames de petróleo que han recibido mucha atención y protesta pública se han producido en ambientes marinos, quedando en un segundo plano la preocupación para el ambiente de agua dulce. No obstante, los derrames petroleros que se producen en las aguas dulces, son consecuencia de las actividades relacionadas con hidrocarburos en este ambiente (Green y Trett, 1989). En este sentido, los estudios ecotoxicológicos han sido enfocados en gran medida sobre los efectos del derrame del petróleo en grandes organismos tales como macrófitas (Pezeshki *et al.*, 2000; Kotta *et al.*, 2009; Leiger *et al.*, 2012), aves (Jenssen, 1994), peces (Carls *et al.*, 1999) o mamíferos marinos (Engelhardt, 1983). Sin embargo, para un mayor entendimiento de estos efectos en la

totalidad del ecosistema es crucial involucrar también estudios en taxa pequeñas usando rigurosos experimentos (Lennuk *et al.*, 2015).

Entre los integrantes de los ecosistemas acuáticos, el zooplancton constituye una comunidad clave. Sus componentes poseen un rol central en las tramas tróficas, y su elevada sensibilidad a los cambios físicos y químicos del medio los torna adecuados para su utilización como bioindicadores y su importancia radica en el hecho que contribuyen al transporte de materia y energía desde los niveles tróficos inferiores hacia los superiores (Ortiz *et al.*, 2006). Además, reúnen características para ser usados como herramientas ecotoxicológicas ya que son organismos sencillos, prácticos, sensibles y reproducibles (Iannacone *et al.*, 1998; Alayo y Iannacone, 2002). En este sentido, permiten evaluar no sólo los efectos directos, sino también el impacto indirecto de los contaminantes, otorgando mayor representatividad a los resultados obtenidos y estimaciones a largo plazo (Boyd, 2010).

El impacto del petróleo crudo en la comunidad planctónica ha sido considerado en algunos estudios (Varela *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2012), señalándose que los efectos reportados de los derrames petroleros son probablemente confusos debido a las variables ambientales que no son consideradas en el diseño del muestreo (temperatura, salinidad, pH, transparencia). Como consecuencia, el efecto adverso del hidrocarburo no puede ser distinguido a menudo (Batten *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2011). Además, no se ha estudiado el hecho que la contaminación por petróleo induce respuestas en diferentes estados de vida en organismos planctónicos, aunque se espera que la talla de los mismos module las respuestas a la intoxicación de la biota (Brooks *et al.*, 2003; Arzate-Cárdenas *et al.*, 2011; Lennuk *et al.*, 2015).

En ambientes acuódulces, el zooplancton está compuesto principalmente por rotíferos, cladóceros y copépodos. En términos de biomasa los cladóceros son generalmente los taxa dominantes, y debido que no presentan estadio naupliar, maduran rápidamente y ocupan todo tipo de hábitats disponibles; siendo los géneros *Moina*, *Diaphanosoma*, *Ceriodaphnia* y *Daphnia* los más estudiados (Sánchez-Ortiz *et al.*, 2010).

Uno de los ensayos biológicos más utilizados a nivel internacional para el

análisis de toxicidad de productos químicos es el ensayo de toxicidad aguda con crustáceos dafnidos, y es la especie *Daphnia magna* la mayormente usada y recomendada como especie modelo estándar (Personne *et al.*, 2009), dado a que se encuentra entre los principales consumidores lenticos primarios (Smirnov, 2013). Se reproduce generalmente en condiciones favorables (temperatura del agua entre 20-22°C, pH de 6 a 9). Los huevos presentan una cubierta sencilla y son incubados en la cámara dorsal, ubicada entre dos valvas, permaneciendo en ella como embriones hasta su eclosión. Los individuos liberados son morfológicamente similares al adulto. El número de eventos reproductivos o camadas varía con las condiciones del medio y de la hembra (Hallam *et al.*, 1990).

Al ser herbívoro, *D. magna* ocupa una posición trófica importante al vincular a los productores primarios con los consumidores secundarios (Allen *et al.*, 1995). Por lo tanto, cualquier alteración en la salud de *Daphnia* y la dinámica de la población puede afectar el ecosistema. La utilización de estos cladóceros se debe a que son fáciles de cultivar en el laboratorio, tienen un ciclo de vida corto y pueden mantenerse a altas densidades de población en volúmenes relativamente pequeños de medio (Martins *et al.*, 2007). Se ha determinado que *D. magna* es sensible a una amplia variedad de contaminantes químicos y físicos que se encuentran comúnmente en el ambiente acuático (Villarroel *et al.*, 2003; Lampert, 2006; Harris *et al.*, 2012). Además es capaz de reaccionar a los cambios en su entorno con una variedad de respuestas fisiológicas, anatómicas y conductuales (Michels *et al.*, 2000; Nakari y Huhtala, 2008), y en su mortalidad, en el caso de toxicidad severa (Taylor *et al.*, 1998; Lari *et al.*, 2017).

A nivel mundial existen estudios sobre la exposición de *Daphnia* a diversos tóxicos incluyendo petróleo crudo o sus componentes (Geiger y Buikema, 1981; Martinez-Jeronimo *et al.*, 2005; Navas *et al.*, 2006; Lennuk *et al.*, 2015; Blinova *et al.*, 2017) que muestran efectos tóxicos. No obstante, a pesar que Venezuela cuenta con las mayores reservas de petróleo del mundo (OPEC, 2016) y que la industria petrolera es el principal motor de su economía (PDVSA, 2015) no se conoce el grado de contaminación de los ecosistemas acuáticos empleando en bioensayos *Daphnia magna* como especie modelo, por lo que es necesario evaluar los efectos de la contaminación por petróleo

sobre los ecosistemas acuódulces del país, ya que los ensayos de toxicidad para estimar los impactos ambientales producidos por este contaminante han sido realizados en su mayoría con especies zooplanctónicas marinas, y debido a la facilidad de manejo de *D. magna* en el laboratorio, en esta investigación se planteó evaluar el efecto de la fracción acuosa de petróleo sobre el crecimiento y composición bioquímica del mencionado cladóceros.

# METODOLOGÍA

## 1.- Cultivo de los organismos

Se utilizó una cepa de *Daphnia magna*, proveniente de la Universidad de Concepción (Chile) y mantenida en el Laboratorio de Biotecnología de Zooplancton de la Universidad de Oriente. Cultivada en agua dura, es decir, agua destilada con alta concentración en sales carbonatadas (APHA, 1998), la cual fue esterilizada en autoclave (15 psi/ 120°C/15 min).

La microalga empleada durante la alimentación de los daphnidos fue *Scenedesmus quadricauda*, (BGAUDO-253) la cual fue donada por el Banco de Germoplasma de Algas, de la Universidad de Oriente. Cultivada en agua destilada, esterilizada y fertilizada con medio f/2 (Guillard, 1975) con una concentración de 8 mmol/L, bajo condiciones controladas de temperatura ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), iluminación (2000 lux), fotoperiodo (24:0) y aireación constante (200 mL/min).

## 2.- Preparación de la fracción acuosa de petróleo

Se empleó petróleo venezolano, Línea 26 Troncal 54 (PDVSA), preparándolo para ser empleado en los bioensayos de acuerdo a Martínez-Jeronimo *et al.* (2005); para ello, se mezcló agua destilada estéril y petróleo en una proporción 9:1. Esta mezcla se llevó a cabo durante 18 horas continuas en una plancha de agitación marca Jenway modelo 1000; adicionalmente se dejó cinco (5) horas en reposo para su separación con ayuda de un embudo de separación. Transcurrido este tiempo, se tomó la parte soluble, convirtiéndose así en la solución madre.

## 3.- Concentración letal media (LC<sub>50</sub>) de la fracción acuosa del petróleo

Para seleccionar la concentración de la FAP a utilizar en el experimento de toxicidad se realizaron bioensayos preliminares, empleando intervalos de concentraciones amplios, siguiendo las recomendaciones de Lennuk *et al.* (2015). Para tal fin, se tomaron 10 neonatos de *D. magna* (de la misma cohorte) que fueron expuestos por triplicado, a diferentes concentraciones del xenobiótico (a partir de la solución

madre): 0 (control); 0,5; 1; 5; 10; 25; 50; 75 y 100%, en Erlenmeyer's de 50 mL. Los daphnidos no fueron alimentados durante la duración de la prueba (48 h).

#### **4.- Bioensayo**

Una vez determinada la concentración letal media de la fracción acuosa, se colocaron por triplicado, 10 cladóceros en Beacker's de 1 L, con un volumen de exposición de 500 mL, tanto para el control (sin FAP) como los expuestos a la concentración de FAP seleccionada.

#### **5.- Crecimiento de *Daphnia magna***

Se suministró alimento (*Scenedesmus quadricauda*) de manera interdiaria (cada 48 horas) a razón de  $5 \times 10^5$  cél/mL (equivalente a 1,5 mg microalga/mL), retirándose las heces y sobrante de comida en ese lapso de tiempo. Con la misma periodicidad, el 30% del medio fue renovado asegurando la estabilidad de la concentración determinada. La experiencia tuvo una duración de 21 días, a condiciones controladas de temperatura ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), iluminación (2000 lux) y fotoperiodo (24:0).

#### **6.- Parámetros de crecimiento**

##### **6.1.- Supervivencia o porcentaje de mortalidad**

Para la supervivencia o porcentaje de mortalidad, se calculó el número de *D. magna* sobreviviente desde el inicio (día 0) al día 21 según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{Número de individuos expuestos}}{\text{Número de individuos al final de exposición}} \times 100$$

##### **6.2.- Edad de la primera reproducción**

Considerada como la edad en la cual aparece la primera cría en situación experimental (Chi-Hsiang y Armitage, 1980).

### 6.3.- Total de progenie

Durante el período de ensayo los neonatos nacidos fueron retirados de cada tratamiento (con y sin FAP), y contabilizados manualmente para obtener un estimado de la totalidad de progenie/tratamiento.

### 6.4.- Producción de huevos epífios

Huevos no viables producidos por las daphnias durante el tiempo de duración de la experiencia y que aparecen cuando las condiciones ambientales son adversas (Vazquez *et al.*, 1986).

## 7.- Composición bioquímica

### 7.1.- Proteínas totales

La cuantificación se llevó a cabo por el método Lowry *et al.* (1951). Para lo cual se resuspendieron aproximadamente 5 mg de daphnidos en 5 mL de NaOH 0,1 mol/L y se colocaron durante una (1) hora en baño de María (95-100°C). Posteriormente, se procedió a centrifugar las muestras a 3 000 rpm/15 min y del sobrenadante se tomó por triplicado, un volumen de 0,6 mL, al cual se le adicionó 0,4 mL de agua destilada. Tanto para la curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA) como para el blanco y las muestras hidrolizadas se les añadió 0,4 mL de NaOH 0,1 mol/L y 2 mL de NaCO<sub>3</sub> al 5 % m/v, al cual se le adicionó previamente una solución de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O al 0,5 % m/v en tartrato de potasio al 1 % m/v, en una relación 50:2 v/v.

Todas las muestras fueron dejadas en reposo durante 10 min a temperatura ambiente y luego se les agregó 0,4 mL de una mezcla 1:1 v/v de reactivo de fenol Folin Ciocalteau (Sigma) con agua destilada. Después de agregarle todos los reactivos, las muestras se conservaron a temperatura ambiente durante 30 min, y por último se realizaron lecturas de las absorbancias en un espectrofotómetro marca Jenway a una longitud de onda de 750 nm, utilizando cubetas de 3 mL de capacidad (Standard Ltd.) contra el blanco.

Para la cuantificación de las proteínas se utilizó como estándar una solución de

seroalbúmina bovina (BSA) de 1 mg/mL. Los valores de absorbancia de BSA fueron utilizados para la elaboración de la curva patrón mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados y los valores de proteínas en las muestras problemas se calcularon por interpolación utilizando dicha curva. El contenido de proteínas totales se expresó en porcentaje, con relación a la masa seca y corresponden al promedio de todas las réplicas.

## 7.2.- Carbohidratos totales

La cuantificación de carbohidratos totales se hizo por el método fenol-ácido sulfúrico establecido por Dubois *et al.* (1956), resuspendiéndose aproximadamente 5 mg de daphnidos en 5 mL de NaOH 0,1 mol/L y fueron colocados durante una (1) hora en baño de María (95-100°C). Posteriormente, se procedió a centrifugar dichas muestras y del sobrenadante se tomó por triplicado 0,3 mL de muestra, luego se les añadió 0,7 mL de NaOH 0,1 mol/L y 0,5 mL de fenol al 5%. Luego, se procedió a colocar las muestras en un baño de hielo y se les agregaron 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado para seguidamente colocarlas en baño de María (95-100°C) por 15 min; transcurrido dicho tiempo, las muestras se colocaron nuevamente en agua fría por 15min. El blanco fue preparado con 1 mL de NaOH 0,1 mol/L; 0,5 mL de fenol al 5% y 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, procediéndose de la misma manera que con las muestras experimentales.

Finalmente, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro marca Jenway a una longitud de onda de 490 nm en un tiempo no mayor de una hora. Adicionalmente, se realizó una curva de calibración con soluciones patrones de glucosa (D-Glucosa; Sigma, G-5767) de 1 mg/mL y la absorbancia será medida a 490 nm. Los valores de absorbancia de la glucosa estándar se utilizaron para la elaboración de la curva patrón mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados, y los valores de carbohidratos en las muestras problemas fueron calculados por interpolación utilizando dicha curva. El contenido de carbohidratos totales se expresó en porcentaje, con relación a la masa seca, correspondiendo al promedio de todas las réplicas.

### 7.3.- Lípidos totales

#### 7.3.1.- Extracción

La extracción de lípidos totales se realizó con la metodología descrita por Bligh y Dyer (1959), la cual consiste en colocar en tubos de ensayo, 5 mg de daphnidos con 7,5 mL de  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (1:2 v/v); seguidamente, se les añadió 1,5 mL de  $\text{CHCl}_3$  (cloroformo) y 1,5 mL de agua destilada, con el fin de lograr la separación de la fase polar de la apolar. Estos tubos fueron agitados con ayuda de un vórtex y colocados en reposo durante un período de 24 h a una temperatura de 4°C (refrigerándolos). Posteriormente, se centrifugaron a 3 000 rpm/10 min para promover una separación más fácil de las fases mencionadas. La fase polar fue descartada y la apolar se colocó en tubos limpios a los cuales se les adicionó 0,5 mL de acetona de alta pureza. El extracto lipídico de cada tubo se sometió a un proceso de desecación mediante la evaporación del  $\text{CHCl}_3$  con una corriente de nitrógeno gaseoso.

#### 7.3.2.- Cuantificación

La cuantificación de los lípidos totales se llevó a cabo según recomendaciones de Marsh y Weinstein (1966). Para ello, los extractos lipídicos de los daphnidos se resuspendieron en 1 mL de  $\text{CHCl}_3$ , luego se repartieron por triplicado, en alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  de cada uno de estos extractos en tubos con tapa de rosca. Paralelamente, se preparó una solución de tripalmitina en  $\text{CHCl}_3$  (0,03-0,27 mg/mL) que se utilizó como patrón. Las muestras, curva patrón y blanco ( $\text{CHCl}_3$ ) se evaporaron en una estufa a 37°C, después de ocurrido este proceso, todos los tubos se enfriaron a temperatura ambiente y se les añadieron 2 mL de  $\text{H}_2\text{S}$  concentrado. Luego, los tubos se colocaron dentro de la estufa a 200°C durante 15 min, para la carbonización del extracto lipídico. A continuación, los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante unos 20 minutos e inmediatamente se colocaron a 4°C durante 5 min. Seguidamente, les fueron añadidos 3 mL de agua destilada a cada tubo, mezclándose bien para colocarlos nuevamente a 4°C. Una vez fríos, se colocaron a temperatura ambiente durante 10 min, hasta que desaparecieran todas las burbujas para leer la absorbancia de las muestras a 375 nm en

un espectrofotómetro marca Jenway.

Los valores de absorbancia de tripalmitina se utilizaron para la elaboración de la curva patrón mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados y los valores de lípidos en las muestras problemas fueron calculados por interpolación utilizando dicha curva. El contenido de lípidos totales se expresó en porcentaje, con relación a la masa seca, correspondiendo al promedio de todas las réplicas.

## **8.- Análisis estadísticos**

La determinación del valor de la  $LC_{50}$  se realizó mediante el software denominado análisis Probit, que permite estimar el  $LC_{50}$  ajustando los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancias, transformándolas en unidades Probit, realizando el ajuste a una línea de regresión (Finney, 1971). Los valores de los diferentes parámetros de crecimiento y bioquímicos fueron comparados mediante ANOVA sencillo. Previamente se evaluó la homocedasticidad (prueba de Bartlett) y normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) de los datos. La determinación de diferencias entre grupos evaluados se hizo mediante prueba *a posteriori* de Tukey (Zar, 1996), a través del Software Statgraphic Centurion XVIII.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Concentración letal media (LC<sub>50</sub>) de la fracción acuosa del petróleo

Los resultados de los ensayos de ecotoxicidad de FAP para *D. magna* se presentan en la Tabla 1, donde se muestran los valores de LC<sub>50</sub> y los intervalos de confianza (p= 95%) correspondientes a la prueba Probit, la cual arrojó una toxicidad aguda relativamente baja (5%) de la fracción soluble en agua; que según la clasificación de Metelev *et al.* (1983) se trata de una sustancia altamente tóxica (1 a 10 mg L<sup>-1</sup>). Este resultado permite inferir que la FAP del petróleo usado puede tener grandes impactos en el crecimiento y reproducción de *D. magna*, similar a los resultados obtenidos con zooplancton marino (Cohen *et al.*, 2014; Lively y McKenzie, 2014). De igual manera, Laws (1993) señala que valores de LC<sub>50</sub> que oscilan entre 2 y 28 mg L<sup>-1</sup> para invertebrados acuáticos y peces expuestos a hidrocarburos de elevado peso molecular, producen una mayor toxicidad aguda que los de bajo peso molecular; lo que sugiere que la FAP usada en esta investigación proviene de un petróleo pesado.

Tabla 1. Análisis Probit de la LC<sub>50</sub>.

Método	LC <sub>50</sub>	Límites de confiabilidad 95%		Pendiente
		Inferior	Superior	
Probit	5,08	1,36	12,29	0,78

### Parámetros de crecimiento

Edad de la primera reproducción, progenie total y producción de huevos epífitos

Durante la realización del trabajo se halló que la fracción acuosa de petróleo redujo la edad de la primera reproducción de los dafnidos (5 días) en comparación con el control (7 días) (Figura 1), lo que hace presumir que probablemente la concentración de FAP aplicada es capaz de estimular la reproducción temprana, atribuyéndose este comportamiento al hecho que la concentración de FAP empleada era subletal, lo que posiblemente actuó como un estimulante al disminuir la producción de lípidos en los

organismos, lo que probablemente está relacionado con el gasto energético de estas reservas en la reproducción (Goulden y Place, 1993). Estos resultados son menores a los presentados por Martínez-Jeronimo *et al.* (2005) quienes en su tratamiento control obtuvieron la primera reproducción de *D magna* a los nueve (9) días de cultivo y ocho (8) días cuando la expusieron a 5% de FAP de petróleo proveniente de Caparoso, México; lo que conlleva a considerar que el petróleo de la FAP empleada en este trabajo estimuló la reproducción temprana del cladócero. Por lo tanto, posiblemente los efectos tóxicos de petróleo sobre los organismos dependerán del tiempo de exposición y de la sensibilidad de éstos al contaminante.

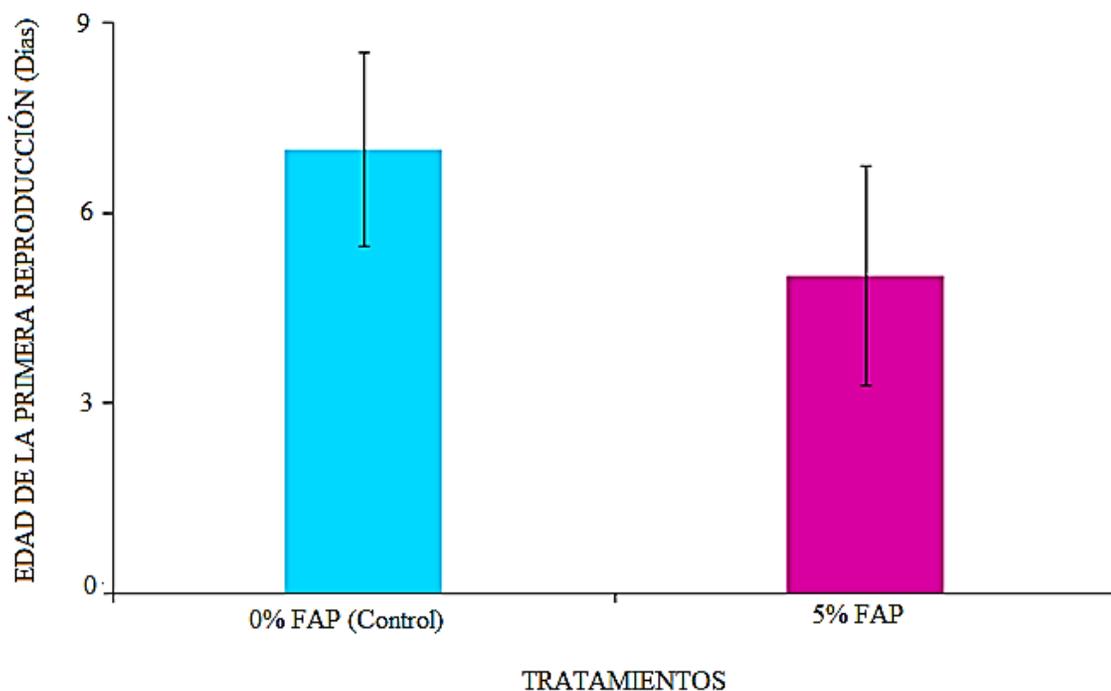


Figura 1. Edad de la primera reproducción (días) de *Daphnia magna* sometida a 0 % (control) y 5% de FAP.

En tanto, la Figura 2 muestra los resultados referidos a la progenie total, y en la que se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre ambos tratamientos (control:  $F = 0,000$  y 5% de FAP:  $F = 0,000$ ) con respecto al día de cultivo. No obstante, el valor más alto en progenie ( $467,67 \pm 8,31$ ) fue logrado en los cladóceros expuestos a

5% FAP comparados con los del control ( $425,00 \pm 8,43$  neonatos); obteniéndose mayor número de individuos al día 15 de cultivo (control:  $68,67 \pm 8,43$ ; 5% FAP:  $61,67 \pm 8,31$ ). Estos resultados son mayores a los reportados por Martínez-Jeronimo *et al.* (2005), quienes encontraron una progenie total de  $170,1 \pm 6,4$  neonatos en el control y  $109,1 \pm 10,8$  neonatos en 5% de FAP, proveniente de Caparroso, México.

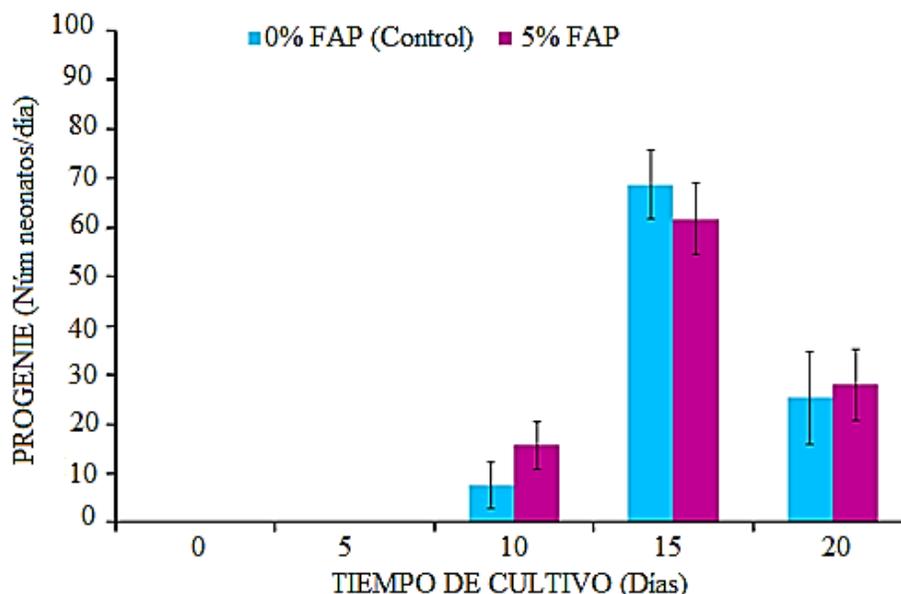


Figura 2. Progenie de *Daphnia magna* (Núm neonatos/día) sometida a 0% (control) y 5% de FAP durante 20 días de cultivo.

Esta respuesta del cladóceros ante la FAP probablemente se deba a que una vez satisfechas las necesidades del mantenimiento basal, la energía puede asignarse a procesos altamente exigentes como la reproducción, creando un equilibrio entre dos respuestas de mayor importancia biológica, la supervivencia y reproducción, ambas necesarias para el mantenimiento de las especies (Arzate-Cárdenas y Martínez-Jerónimo, 2011), así como ocurrió durante el desarrollo de esta investigación, en la cual *Daphnia magna* no sólo acortó el tiempo del inicio de su reproducción sino que también arrojó valores de progenie total similares al control; además de una aceptable supervivencia, como se verá más adelante.

Cabe señalar, que durante la realización del estudio no se produjeron huevos epíftios, lo que hace deducir que el petróleo utilizado y la concentración elegida no producen un efecto adverso en la reproducción de los dáfidos, y que las condiciones de cultivo fueron las idóneas para su desarrollo.

### Supervivencia

La supervivencia encontrada al final del ensayo, como se evidencia en la Tabla 2; fue de  $93,33 \pm 3,85$  % en el control y de  $76,67 \pm 3,85$  % en los dáfidos expuestos al 5% de FAP; lo que demuestra que este cladóceros fue tolerante a la dilución de petróleo probada ó a que el efecto de la FAP fue subletal. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en el control ( $F = 0,004$ ), no así en la FAP, en la que no se encontraron diferencias ( $p > 0,05$ ) estadísticamente significativas (5% FAP,  $F = 0,4058$ ) con respecto a los días de cultivo.

Tabla 2. Porcentaje de supervivencia de *Daphnia magna* sometida a 0% (control) y 5% de FAP durante 20 días de cultivo.

Tratamientos	% Supervivencia
0% FAP (Control)	$93,33 \pm 3,85$
5% FAP	$76,67 \pm 3,85$

Estos valores fueron mayores a los reportados por Martínez-Jeronimo *et al.* (2005) quienes trabajaron con fracciones acuosas de petróleo y aceite crudo con caolin (tipo de arcilla empleada en la extracción de petróleo) procedentes de diferentes lugares de México reportaron una supervivencia de 60% al aplicar una concentración subletal de 5% establecida por el criterio de factores de aplicación (FA) con el hidrocarburo procedente de Caparrosa, México. No obstante, los resultados encontrados en este estudio fueron ligeramente menores a los de Lennuk *et al.* (2015) quienes al someter a *Daphnia magna* a diferentes concentraciones de petróleo encontraron una alta tasa de supervivencia (81%) a bajas concentraciones del tóxico ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Hay que considerar que los efectos de la contaminación por hidrocarburos en el plancton son complejos e involucran muchos mecanismos indirectos y directos, donde los efectos se deben al aumento de la concentración de petróleo (Lennuk *et al.*, 2015). El impacto indirecto de la contaminación por hidrocarburos en el plancton puede provocar la disminución de la concentración de oxígeno disuelto y la degradación relacionada en los parámetros de calidad del agua, lo que se refleja en la tasa de supervivencia del organismo (Harrel, 1985; Neff y Stubblefield, 1995; Li y Boufadel, 2010).

### **Composición bioquímica**

Los análisis bioquímicos revelaron que los mayores niveles de carbohidratos ( $55,44 \pm 10,99$  %) fueron encontrados en los cladóceros expuestos a la FAP, en tanto, el mayor nivel de proteínas ( $27,83 \pm 3,24$  %) y de lípidos ( $1,1 \pm 0,002$ %) lo presentaron las daphnias del tratamiento control (Figura 3). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el nivel de proteínas ( $p < 0,05$ ;  $F = 0,004$ ) entre los dos tratamientos (control y 5% FAP), así como en el nivel de lípidos ( $p < 0,05$ ;  $F = 0,000$ ); no así en el nivel de carbohidratos, en el que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ;  $F = 0,2873$ ).

Entre las macromoléculas que componen el contenido bioquímico, las que aportan una mayor cantidad de energía y que se espera que disminuyan en mayor medida son los lípidos, que están significativamente involucrados en la reproducción del cladóceros (Goulden y Place, 1993), tal como ocurrió en este trabajo donde disminuyeron significativamente, al igual que el contenido de proteínas. La disminución en el contenido de proteínas puede deberse al hecho de que estos componentes participan en la formación de lipoproteínas involucradas en la reparación del daño celular y tisular (Bhavan y Geraldine, 2001; Ribeiro *et al.*, 2001).

En lo referente a los carbohidratos, si bien estos carbohidratos aportan menos calorías que las proteínas y los lípidos (menos de la mitad de las aportadas por estos últimos), constituyen una importante reserva energética que se puede asimilar y degradar fácilmente para obtener energía y poder afrontar los efectos nocivos de agentes tóxicos (Sancho *et al.*, 1996). Por lo que no se puede descartar la posibilidad de que los

cladóceros expuestos a la FAP almacenaron energía en forma de carbohidratos para su uso habitual en procesos de desintoxicación y como protección contra la FAP, desviando la energía a la producción de quitina de su exoesqueleto, porque tal como lo señala Cauchie (1997) la producción de quitina por *D. magna* parece mayor que la de la mayoría de los otros crustáceos, especialmente en lo que respecta a las especies marinas.

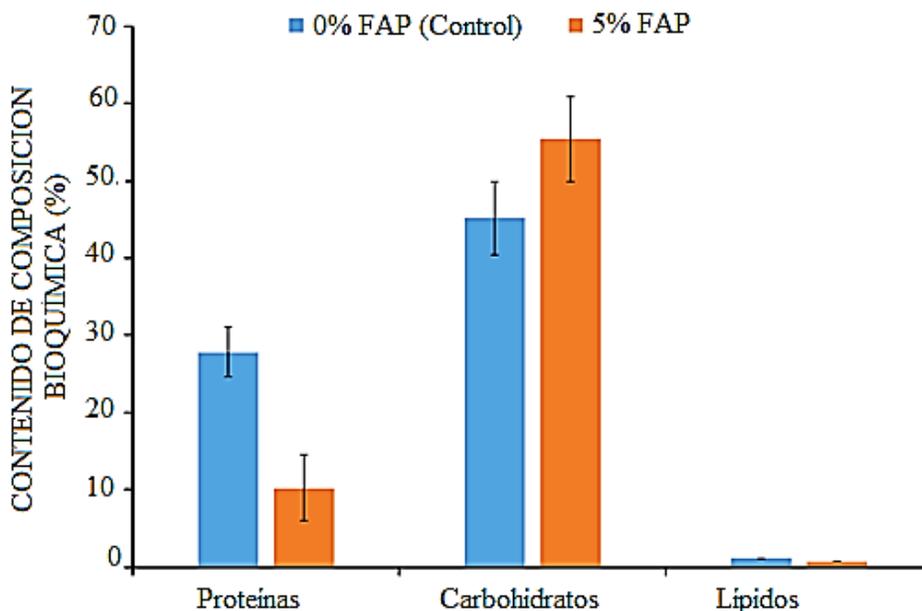


Figura 3. Contenido bioquímico (proteínas, carbohidratos, lípidos) de *Daphnia magna* expuesta a diferentes concentraciones de fracción acuosa de petróleo.

Por otro lado, si la demanda energética no se satisface mediante la asimilación de los alimentos, en los cladóceros se ha observado un aumento de la actividad de enzimas asociadas al catabolismo de los carbohidratos, ya sea el de la glucólisis o del ciclo del ácido tricarboxílico (Begum, 2004). Dado que los organismos obtienen energía a través de la dieta y esta última no fue un factor limitante en los ensayos realizados, en el presente estudio se puede inferir que los organismos expuestos aumentaron su catabolismo de carbohidratos para combatir los efectos tóxicos de la FAP.

De manera general, los resultados muestran que *Daphnia magna* pudo hacer uso de una estrategia conocida como "estrategia de ahorro", la cual aplica cuando existe

circunstancias que favorecen un alto contenido de carbohidratos, baja disponibilidad de lípidos y proteínas, lo que le permite maximizar su crecimiento somático. Lo que hace considerar que *D. magna* usa los carbohidratos para obtener energía y ahorrar proteínas y lípidos como componentes estructurales (Taipale *et al.*, 2016).

En general, el estudio actual mostró un impacto importante de la FAP en los parámetros de crecimiento, reproducción, supervivencia y composición bioquímica, otorgando de esta manera a la especie *Daphnia magna* una relevante importancia como modelo como o centinela de la contaminación por hidrocarburos, al mostrar claros cambios en algunos parámetros de su ciclo biológico.

## CONCLUSIONES

La FAP del petróleo empleado resultó altamente tóxico, al mostrar un  $LC_{50}$  y una toxicidad aguda, con una relativa baja concentración (5%).

La inducción temprana en producción de neonatos, una vez que *Daphnia magna* se ve expuesta a la FAP, sugiere que este xenobiótico ejerció un efecto desencadenante de la reproducción de esta especie de Cladóceros.

La FAP del petróleo afectó la composición bioquímica del cladóceros, evidenciada en el aumento de los carbohidratos y la disminución en los niveles de lípidos, probablemente para contrarrestar los efectos tóxicos del xenobiótico y favorecer la realización de procesos metabólicos básicos.

Dados los cambios observados en importantes aspectos de la fisiología, el metabolismo energético y reproducción del cladóceros *Daphnia magna* a la exposición a la FAP, se puede concluir que esta especie podría ser utilizado como importante centinela o indicador de la contaminación por hidrocarburos, en los espacios acuidulces.

## **RECOMENDACIONES**

Para mejorar el entendimiento de las causas de toxicidad provocadas por fracciones acuosas de petróleo, es necesario examinar la toxicidad de una mayor diversidad de ingredientes químicos del petróleo, ya que este contaminante posee una compleja y extrema variabilidad en su composición.

Es necesario realizar bioensayos que involucren un periodo más largo de tiempo tanto en la determinación de la  $LC_{50}$  (96 horas) como en los bioensayos de determinación de efectos (30 días), así como emplear especies de cladóceros autóctonas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adeniji, A.; Okoh, O. y Okoh, A. 2017. Petroleum hydrocarbon fingerprints of water and sediment samples of Buffalo River Estuary in the Eastern Cape Province, South Africa. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017: 1-13.
- Alayo, M. e Iannacone, J. 2002. Ensayos ecotoxicológicos con petróleo crudo, diesel 2 y diesel 6 con dos subespecies de *Brachionus plicatilis* Müller 1786 (Rotifera: Monogononta). *Gayana*, 66(1): 45-58.
- Allen, Y.; Calow, P. y Baird, D. 1995. A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology Chemistry*, 14: 1625-1630.
- APHA (American Public Health Association). 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Vigésima edición. American Public Health Association. Washington, USA.
- Arzate-Cárdenas, M. y Martínez-Jerónimo, F. 2011. Age-altered susceptibility in hexavalent chromium-exposed *Daphnia schodleri* (Anomopoda: Daphniidae): integrated biomarker response implementation. *Aquatic Toxicology*, 105(3-4): 528-534.
- Arzate-Cárdenas, M.; Ortiz-Butron, R. y Martinez-Jeronimo, F. 2011. Age effect on the antioxidant activity of *Daphnia magna* (Anomopoda: Daphniidae): does younger mean more sensitivity? *Journal of Environmental Biology*, 32: 481-487.
- Baker, J. 2001. Oil pollution. En: *Encyclopedia of ocean sciences*. Steele, J.; Thorpe, S. y Turekian, K. (eds). Volumen 4. Academic Press. New York, USA. Págs. 1999-2007.
- Batten, S.; Allen, R. y Wotton, C. 1998. The effects of the Sea Empress oil spill on the plankton of the southern Irish Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 36: 764-774.
- Begum, G. 2004. Carbofuran insecticide-induced biochemical alterations in the liver and the muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (Linn) and recovery response. *Aquatic Toxicology*, 66: 83-92.
- Bennet, A.; Bianchi, T.; Means, J. y Carman, K. 1999. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbon marsh sediments contamination and grazing on the abundance and composition of microphytobenthos in salt (Pass Fourchon, LA). I. A microcosm experiment. *Journal Express of Marine Biology and Ecology*, 242: 1-20.
- Bhavan, P. y Geraldine, P. 2001. Biochemical stress responses in tissues of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on exposure to endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 70: 27-41.
- Bligh, E. y Dyer, W. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911-917.

- Blinova, I.; Kanarbik, L.; Irha, N. y Kahru, A. 2017. Ecotoxicity of nanosized magnetite to crustacean *Daphnia magna* and duckweed *Lemna minor*. *Hydrobiologia*, 798: 141-149.
- Boyd, R. 2010. Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *Journal of Chemical Ecology*, 36: 46-58.
- Brooks, B.; Turner, W.; Stanley, P.; Weston, J.; Glidewell, E.; Foran, C.; Slattery, M.; La Point, T. y Huggett, D. 2003. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere*, 52: 135-142.
- Cauchie, H. 1997. An attempt to estimate crustacean chitin production in the hydrosphere. En: *Advances in chitin science*. Volumen II. Domard, A.; Roberts, G. y Varum, K. (eds). Jacques André Publisher, Lyon. Paris, Francia. Págs. 32-39.
- Carls, M.; Rice, S. y Hose, J. 1999. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval Pacific herring (*Clupeapallasi*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18: 481-493.
- Chi-Hsiang, L. y Armitage, K. 1980. Growth, development and body size of field and laboratory populations of *Daphnia ambigua*. *OIKOS*, 35: 31-48.
- Cohen, J.; McCormick, F. y Burkhardt, S. 2014. Effects of dispersant and oil on survival and swimming activity in a marine copepod. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92: 38-387.
- Dodson, S. y Hanazato, T. 1995. Commentary on effects of anthropogenic and natural organic chemicals on development, swimming behavior, and reproduction of *Daphnia*, a key member of aquatic ecosystems. *Environmental Health Perspectives*, 103(4): 7-11.
- Drude, L. y Malm, O. 2008. Mercury contamination in aquatic ecosystems: an analysis of the critical areas. *Estudos avançados*, 22(63): 173-190.
- Dubois, M.; Gilles, K.; Hamilton, J.; Rebers, P. y Smith, F. 1956. Calotimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Engelhardt, R. 1983. Petroleum effects on marine mammals. *Aquatic Toxicology*, 4: 199-217.
- Finney, D. 1971. *Probit analysis*. Third edition. Cambridge University Press. London, England.
- Geiger, J. y Buikema, A. 1981. Oxygen consumption and filtering rate of *Daphnia pulex* after exposure to water-soluble fractions of naphthalene, phenanthrene, N° 2 fuel oil, and coal-tar creosote. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 27(6): 783-789.
- Goulden, C. y Place, A. 1993. Lipid accumulation and allocation in daphniid cladocera.

- Bulletin of Marine Science*, 53: 106-114.
- Green, J. y Trett, M. 1989. *The fate and effects of oil in freshwater*. Science. London, England.
- Guillard, R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: *Culture of marine invertebrates animals*. Smith, M. y Chanley, M. (eds). Plenum Press. New York, USA. Págs. 29-60.
- Hallam, T.; Lassiter, R.; Li, J. y Suárez, L. 1990. Modelling individuals employing an integrated energy response: applicaton to *Daphnia*. *Ecology*, 71: 938-954.
- Harrel, R. 1985. Effects of a crude oil spill on water quality and macrobenthos of a southeast Texas stream. *Hydrobiologia*, 124: 223-228.
- Harris, K.; Bartlett, N. y Lloyd, V. 2012. *Daphnia* as an emerging epigenetic model organism. *Genetics Research International*, 201: 1-8.
- Hodge, V.; Fan, G.; Solomon, K.; Kaushik, N.; Leppard, G. y Burnison, K. 1993. Effects of the presence and absence of various fractions of dissolved organic matter on the toxicity of fenvalerate to *Daphnia magna*. *Environmental, Toxicology and Chemistry*, 12: 167-176.
- Hu, C.; Weisberg, R.; Liu, Y.; Zheng, L.; Daly, K.; English, D.; Zhao, J. y Vargo, G. 2011. Did the northeastern Gulf of Mexico become greener after the Deepwater Horizon oil spill? *Geophysical Research Letters*, 38(9): 1-5.
- Iannacone, J.; Alvarino, L. y Dale, W. 1998. Pruebas ecotoxicológicas como una herramienta para la evaluación del impacto ambiental de los ecosistemas acuáticos. *Boletín de Lima*, 113: 53-68.
- Jaramillo, J.; Rincón, S. y Rico-Martínez, R. 2009. *Toxicología ambiental*. Departamento Editorial de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México.
- Jenssen, B. 1994. Review article: effects of oil pollution, chemically treated oil, and cleaning on thermal balance of birds. *Environmental Pollution*, 86: 207-215.
- Jung, S.; Kown, O.; Joo, C.; Kang, J.; Kim, M.; Shim, W. y Kim, Y. 2012. Stronger impact of dispersant plus crude oil on natural plankton assemblages in short-term marine mesocosms. *Journal of Hazardous Materials*, 217: 338-349.
- Kotta, J.; Aps, R. y Orav-Kotta, H. 2009. *Bayesian inference for predicting ecological water quality under different climate change scenarios*. Volumen 127. WIT Press. Tartu, Estonia.
- Lampert, W. 2006. *Daphnia*: model herbivore, predator and prey. *Polish Journal of Ecology*, 54(4): 607-620.
- Lari, E.; Mohaddes, E. y Pyle, G. 2017. Effects of oil sands process-affected water on the respiratory and circulatory system of *Daphnia magna* Straus, 1820. *Science of the Total Environment*, 605(606): 824-829. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.

06.207.

- Larrain, A. 1995. Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: Importancia de los Bioensayos de Toxicidad. *Revista Ciencia y Tecnología del Mar, Cona(Nº Especial)*: 39-47.
- Laws, E. 1993. *Aquatic pollution: An introductory text*. Segunda edición. New York, USA.
- Lee, K.; Boufadel, M.; Chen, B.; Foght, J.; Hodson, P.; Swanson, S. y Venosa, A. 2015. *Expert panel report on the behaviour and environmental impacts of crude oil released into aqueous environments*. Royal Society of Canada. Ottawa, Canadá.
- Leiger, R.; Aps, R.; Kotta, J.; Orviku, Ü.; Pärnoja, M. y Tõnisson, H. 2012. Relationship between shoreline substrate type and sensitivity of associated habitats at risk to oil pollution. *Ocean and Coastal Management*, 66: 12-18.
- Lennuk, L.; Kotta, J.; Taits, K. y Teeveer, K. 2015. The short-term effects of crude oil on the survival of different size-classes of cladoceran *Daphnia magna*. *Oceanologia*, 57(1): 71-77.
- Lesme, R.; Vega, R. y López, T. 2015. Evaluación de la toxicidad aguda de un extracto acuoso de *Moringa oleifera* mediante el bioensayo en *Daphnia magna*. *Revista Uninorte de Medicina*, 4(1): 127-142.
- Li, H. y Boufadel, M. 2010. Long-term persistence of oil from the Exxon Valdez spill in two-layer beaches. *Nature Geoscience*, 3: 96-99.
- Lively, J. y McKenzie, J. 2014. Toxicity of the dispersant Corexit 9500 to early life stage of blue crab, *Callinectes sapidus*. *Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology*, 93: 649-653.
- Lowry, H.; Rosenbrough, N.; Farr, A. y Randall, J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-75.
- Martins, J.; Oliva, L. y Vasconcelos, V. 2007. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International*, 33(3): 414-425.
- Marsh, J. y Weinstein, D. 1966. Simple Charring method of determination of lipids. *Journal of Lipid Research*, 7: 574-576.
- Martinez-Jeronimo, F.; Villasenor, R.; Rios, G. y Espinosa-Chavez, F. 2005. Toxicity of the crude oil water-soluble fraction and kaolin-adsorbed crude oil on *Daphnia magna* (Crustacea: Anomopoda). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48: 444-449.
- McCauley, R. 1966. The biological effects of oil pollution in a river. *Limnology and Oceanography*, 11: 475-486.
- Mekenyan, O.; Ankley, G.; Veith, G. y Call, D. 1994. QSARs for photoinduced Toxicity. I. Acute lethality of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia*

- magna*. *Chemosphere*, 28: 567-582.
- Metlev, V.; Kanaev, A. y Dzasokhova, N. 1983. *Water toxicology*. Amerind Publishing Co. New Delhi, India.
- Michels, E.; Semsari, S.; Bin, C. y De Meester, L. 2000. Effect of sublethal doses of cadmium on the phototactic behavior of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 47: 261-265.
- Nakari, T. y Huhtala, S. 2008. Comparison of toxicity of congener-153 of PCB, PBB, and PBDE to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(2): 514-518.
- NASEM (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine). 2016. *Spills of diluted bitumen from pipelines: a comparative study of environmental fate, effects, and response*. The National Academies Press. Washington, USA.
- Navas, J.; Babin, M.; Casado, S.; Fernández, C. y Tarazona, J. 2006. The Prestige oil spill: a laboratory study about the toxicity of the water-soluble fraction of the fuel oil. *Marine Environmental Research*, 62(Suppl): S352-355.
- Neff, J. y Stubblefield, W. 1995. Chemical and toxicological evaluation of water quality following the Exxon Valdez oil spill. En: *Exxon Valdez Oil Spill: fate and effects in Alaskan waters*. Wells, P.; Butler, J.; Hughes, J. (eds). ASTM STP 1219. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA. Págs. 141-177.
- PDVSA (Petróleos de Venezuela S.A.). 2015. *Petróleos de Venezuela S.A. Informe de gestión*. Caracas, Venezuela.
- OPEC (Organization of the Petroleum Exporting Countries). 2016. *Organization of the Petroleum Exporting Countries. Annual Statistical Bulletin*. Vienna, Austria.
- Ortiz, M.; González, E. y Peñaherrera, C. 2006. Depredación de peces sobre el zooplancton en tres embalses neotropicales con distintos estados tróficos. *Interciencia*, 31(7): 517-524.
- Personne, G.; Baudo, R.; Cotman, M.; Blaise, C.; Thompson, K.; Moreira-Santos, M.; Vollat, B.; Törökne, A. y Han, T. 2009. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test - Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 393: 1-29.
- Peterson, C.; Rice, S.; Short, J.; Esler, D.; Bodkin, J.; Ballachey, B. y Irons, D. 2003. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science*, 302: 2082-2086.
- Pezeshki, S.; Hester, M.; Lin, Q. y Nyman, J. 2000. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environmental Pollution*, 108: 129-139.
- Rand, G. 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assesment*. Second edition. Editorial Taylor & Francis. Whashington,

Estados Unidos.

- Ribeiro, S.; Sousa, J.; Nogueira, A. y Soares, M. 2001. Effects of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 49: 31-138.
- Sánchez, G. y Vera, G. 2001. *Manual introductorio de ecotoxicología acuática*. Informe 161. Instituto del Mar del Perú. Callao, Perú.
- Sánchez-Ortíz, J.; Sarma, S. y Nandini, S. 2010. Comparative population growth of *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia pulex* (Cladocera) exposed to zinc toxicity. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 45: 37-41.
- Sancho, E.; Ferrando, M. y Andreu, E. 1996. Physiological stress responses of *Anguilla anguilla* to fenitrothion. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 31(1): 87-98.
- Silva, J.; Fuentealba, C.; Bay-Schmith, E. y Larrain, A. 2007. Estandarización del bioensayo de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un tóxico de referencia. *Guyana*, 71(2): 135-141.
- Singer, M.; Aurand, D.; Bragin, G.; Clark, J.; Coelho, G. y Sowby, M. 2000. Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. *Marine Pollution of Bulletin*, 40: 1007-1016.
- Smirnov, N. 2013. *Physiology of the Cladocera*. Academic Press. Moscú, Rusia.
- Taipale, S.; Galloway, A.; Aalto, S.; Kahilainen, K.; Strandberg, U. y Kankaala, P. 2016. Terrestrial carbohydrates support freshwater zooplankton during phytoplankton deficiency. *Scientific Reports*, 6: 30897.
- Taylor, D.; Finston, T. y Herbert, P. 1998. Biogeographic of a widespread freshwater crustacean: pseudocongruence and cryptic endemism in the North American *Daphnia laevis* complex. *Evolution*, 52(6): 1648-1670.
- Varela, M.; Bode, A.; Lorenzo, J.; Álvarez-Ossorio, M.; Miranda, A.; Patrocinio, T.; Anadón, R.; Viesca, L.; Rodríguez, N.; Valdés, L.; Cabal, J.; Urrutia, A.; García-Soto, C.; Rodríguez, M.; Álvarez-Salgado, X. y Groom, S. 2006. The effect of the "Prestige" oil spill on the plankton of the N-NW Spanish coast. *Marine Pollution Bulletin*, 53: 272-86.
- Vazquez, A.; Solis, E.; Macedo, N. y Rosas, I. 1986. Influencia de la calidad del agua sobre la ocurrencia de *Daphnia pulex* en la presa José Antonio Alzate y algunos aspectos de su pesquería. *Contaminación Ambiental*, 2: 39-56.
- Villarroel, M.; Sancho, E.; Ferrando, M. y Andreu, E. 2003. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 53(8): 857-864.
- Watts, R. 1998. *Hazardous wastes: sources, pathways, receptors*. John Wiley and sons Ing. New York, USA.

Zar, J. 1996. *Biostatistical analysis*. Tercera edición. Prentice Hall, Upper Saddle River. New Jersey, USA.

## HOJA DE METADATOS

### Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

<b>Título</b>	EFFECTO DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE PETRÓLEO SOBRE EL CRECIMIENTO Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE <i>Daphnia magna</i> (Crustácea: Daphniidae) Strauss, 1820
<b>Subtítulo</b>	

#### Autor (es):

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Márquez S. Lourmarytz del V.	<b>CVLAC</b>	20 346 301
	<b>e-mail</b>	<i>lourmarytzmarquez1993@gmail.com</i>
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	

#### Palabras o frases claves:

Toxicidad
Petróleo
<i>Daphnia magna</i>
Crecimiento
Bioquímica

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Biología

### Resumen (abstract):

Este estudio utilizó una cepa de *Daphnia magna* con el fin de evaluar los efectos de la fracción acuosa del petróleo (FAP) sobre la misma. La FAP se preparó mezclando agua destilada estéril y petróleo crudo en proporción 9:1, a partir de la cual se realizaron ensayos para calcular la LC<sub>50</sub>, exponiendo 10 neonatos de *D. magna* (de la misma cohorte) por triplicado a determinadas concentraciones del xenobiótico (0 (control); 0,5; 1; 5; 10; 25; 50; 75 y 100%), sin recambio de agua ni alimentación. Una vez determinada la LC<sub>50</sub> se procedió a la realización del bioensayo, usando la concentración seleccionada para evaluar los parámetros de crecimiento: supervivencia, edad de la primera reproducción, total de progenie, producción de huevos epíftios; así como la composición bioquímica de los organismos. Los resultados de la LC<sub>50</sub> arrojaron una toxicidad aguda relativamente baja (5%), la cual afectó la edad de la primera reproducción, disminuyendo la producción de neonatos en los organismos expuestos a la FAP a 5 días, mientras que en el control fue de 7 días. Las daphnias expuestas a 5% de FAP presentaron mayor progenie total ( $467,67 \pm 8,31$  dáfidos); en tanto, la supervivencia fue mayor en el control (93,33%). Cabe destacar que los dáfidos de ambos tratamientos no produjeron huevos epíftios. El contenido de carbohidratos fue significativamente mayor en los cladóceros expuestos a la FAP ( $55,44 \pm 10,99\%$ ), mientras que los mayores contenidos de proteínas ( $27,83 \pm 3,24\%$ ) y de lípidos ( $1,1 \pm 0,002\%$ ) lo presentaron las daphnias del tratamiento control. Los resultados muestran que la FAP afecta de manera importante el crecimiento, supervivencia, reproducción y las reservas energéticas de *D. magna*. Estos resultados sumados a su fácil cultivo, reproducción, mantenimiento y su posición en la cadena alimentaria, la convierten en una especie modelo para estudios de contaminación por hidrocarburos, en ambientes acuidulces.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Bastardo V. Dialys C.	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	18 417 112
	e-mail	<i>dialysbastardo58@gmail.com</i>
	e-mail	
Bello P. Jesús A.	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	11 826 733
	e-mail	<i>jesusantoniobello@gmail.com</i>
	e-mail	
Freites V. Luis E.	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	4 181 869
	e-mail	<i>lfreitesv@gmail.com</i>
	e-mail	
Hernández R. Elvira M.	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	16 818 989
	e-mail	<i>arivlehernandez85@gmail.com</i>
	e-mail	

### Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
21	07	27

Lenguaje: spa

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

### Archivo (s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TG-márquez.doc	Word 1997-2003

### Alcance:

**Espacial:** Nacional (Opcional)

**Temporal:** Temporal (Opcional)

### Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado en Biología

**Nivel Asociado con el Trabajo:** Licenciado

**Área de Estudio:** Biología

### Institución (es) que garantiza (n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NÚCLEO DE SUCRE

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Letido el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE SISTEMA DE BIBLIOTECA	Cordialmente,		
RECIBIDO POR <i>[Signature]</i>			
FECHA <u>5/8/09</u> HORA <u>5:30</u>		<b>JUAN A. BOLAÑOS CUNELE</b>	SECRETARIA CONSEJO UNIVERSITARIO
		Secretario	

C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009):** “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



---

Lourmarytz del V. Márquez S.  
AUTORA



---

Dialys C. Bastardo V.  
TUTORA



---

Jesús A. Bello P.  
COTUTOR