

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Efecto toxicológico agudo del cloruro de mercurio en
larvas de *Rhinella spinulosa* Wiegmann.

1834 (Anura: Bufonidae)

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA EN LA ESPECIALIDAD DE ECOLOGÍA Y
RECURSOS NATURALES

Presentado por la:
Bach. CONGA PACHÍN, Karina

AYACUCHO – PERÚ

2017

Con amor eterno a Dios.
A mis padres por su apoyo, consejos, comprensión y amor.

AGRADECIMIENTO

A mi *Alma Mater*, la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y en particular a la Facultad de Ciencias Biológicas y a todos los docentes que contribuyeron en mi formación como profesional y persona útil para nuestra sociedad.

A la Facultad de Ciencias Biológicas por haberme brindado las facilidades para el logro y materialización de mis estudios en la Carrera Profesional de Biología.

A mi asesor MS Elmer Avalos Pérez, por su paciencia, apoyo y orientación en el desarrollo de la presente investigación.

Al Blgo. Reynán Cóndor Alarcón, por haberme apoyado en la sistematización de la información.

INDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
INDICE GENERAL	vii
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEORICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Marco Conceptual	4
2.2.1. Toxicidad	4
2.2.2. Toxicidad aguda	4
2.2.3. Toxico	4
2.2.4. Efecto	4
2.2.5. Larvas	4
2.2.6. Metal pesado	4
2.2.7. Concentración letal media (CL50)	4
2.2.8. Bioensayo	4
2.3. Bases Teóricas	5
2.3.1. Toxicología	5
2.3.2. Toxicidad	5
2.3.3. Dosis letal media (DL50) y concentración letal media (CL50)	5
2.3.4. Indicadores de Toxicología	6
2.3.5. Ecotoxicología	7
2.3.6. Bioensayos	8
2.3.7. Metales Pesados	9
2.3.8. Orden Anura: Familia Bufonidae	12
2.4. Marco legal	14
III. MATERIALES Y METODOS	17
3.1. Ubicación del lugar de muestreo	17
3.2. Población y muestra biológica	17
3.3. Metodología y recolección de datos	17
3.4. Tipo de investigación	19
3.5. Diseño de investigación	19

3.6. Análisis de datos	19
IV. RESULTADOS	21
V. DISCUSION	33
VI. CONCLUSIONES	39
VII. RECOMENDACIONES	41
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	43
ANEXOS	47

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Estándares de calidad ambiental para agua. Categoría 4 Conservación del ambiente acuático	14
Tabla 2. Límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades minero-metalúrgicos.	16
Tabla 3. Características de las unidades experimentales según la concentración del Cloruro de Mercurio y el número de larva dispuesta en ellas.	18
Tabla 4. Porcentaje de mortalidad de <i>Rhinella spinulosa</i> expuestos a concentraciones de cloruro de mercurio en 24, 48, 72 y 96 horas.	22

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estadios de desarrollo de <i>Rhinella spinulosa</i> . Wiegmann, 1834	13
Figura 2. Mortalidad acumulada promedio y desviación típica de larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> (Amphibia: Anura) causada por el Cloruro de Mercurio a las 24 horas de exposición.	23
Figura 3. Mortalidad acumulada y desviación típica de larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> (Amphibia: Anura) causada por el Cloruro de Mercurio a las 48 horas de exposición.	24
Figura 4. Mortalidad acumulada y desviación típica de larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> (Amphibia: Anura) causada por el Cloruro de Mercurio a las 72 horas de exposición.	25
Figura 5. Mortalidad acumulada y desviación típica de larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> (Amphibia: Anura) causada por el Cloruro de Mercurio a las 96 horas de exposición.	26
Figura 6. Mortalidad acumulada de larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> (Amphibia: Anura) causada por el Cloruro de Mercurio a diferentes horas de exposición.	27
Figura 7. Tendencia del porcentaje de mortalidad acumulada calculada por Probit y concentración letal media del Cloruro de Mercurio sobre larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> (Amphibia: Anura) a las 24 horas de exposición.	28
Figura 8. Tendencia del porcentaje de mortalidad acumulada calculada por Probit y concentración letal media del Cloruro de Mercurio sobre larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> (Amphibia: Anura) a las 48 horas de exposición.	29
Figura 9. Tendencia del porcentaje de mortalidad acumulada calculada por Probit y concentración letal media del Cloruro de Mercurio sobre larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> (Amphibia: Anura) a las 72 horas de exposición.	30
Figura 10. Tendencia del porcentaje de mortalidad acumulada calculada por Probit y concentración letal media del Cloruro de Mercurio sobre larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> (Amphibia: Anura) a las 96 horas de exposición.	31

Figura 11 Cantidad de Mercurio total encontrado en larvas de *Rhinella spinulosa* expuestos a diferentes concentraciones de cloruro de mercurio (HgCl₂) 32

INDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Número de larvas muertas de <i>Rhinella spinulosa</i> a diferentes concentraciones del Cloruro de mercurio de 24 a 96 horas de exposición.	48
Anexo 2. Cantidad de Mercurio total encontrado en larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> expuestos a diferentes concentraciones de cloruro de mercurio.	49
Anexo 3. Percentiles (concentración letal en mg/L) del Cloruro de mercurio sobre larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> (Amphibia: Anura) sometidas a las 24 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.	50
Anexo 4. Percentiles (concentración letal en mg/L) del Cloruro de mercurio sobre larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> (Amphibia: Anura) sometidas a las 48 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.	51
Anexo 5. Percentiles (concentración letal en mg/L) del Cloruro de mercurio sobre larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> (Amphibia: Anura) sometidas a las 72 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.	52
Anexo 6. Percentiles (concentración letal en mg/L) del Cloruro de mercurio sobre larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> (Amphibia: Anura) sometidas a las 96 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.	53
Anexo 7. Mapa de ubicación del punto de colecta de las larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> .	54
Anexo 8. Sal de cloruro de mercurio (HgCl ₂)	55
Anexo 9. Placas Petri con contenido de las larvas muertas de <i>Rhinella spinulosa</i> en la estufa para el secado correspondiente.	56
Anexo 10. Batería utilizado para el experimento	57
Anexo 11. Vista de larvas muertas después de haber sido expuestas al compuesto.	58
Anexo 12. Larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> muertas dentro de la placa petri expuestas a una concentración de 0.51 mg/l de HgCl ₂ .	59
Anexo 13. Larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> muertas dentro de la placa Petri expuestas a una concentración de 0.43 mg/l de HgCl ₂	60

Anexo 14. Informe emitido por el laboratorio ENVIROLAB de los resultados de análisis de mercurio.	61
Anexo 15. Informe emitido por el laboratorio ENVIROLAB de los resultados de análisis de mercurio.	62
Anexo 16. Informe emitido por el laboratorio ENVIROLAB de los resultados de análisis de mercurio.	63
Anexo 17. Matriz de consistencia.	64

RESUMEN

Los anfibios, particularmente en sus estados larvales, tienen una gran sensibilidad a la concentración de contaminantes; por lo que se han convertido en una herramienta útil para evaluar cómo las diferentes actividades humanas afectan los ecosistemas acuáticos. Debido a esto se utilizaron larvas de *Rhinella spinulosa* como bioindicadores, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto toxicológico de un metal pesado (mercurio) bajo la forma de cloruro de mercurio (HgCl_2) en cuatro concentraciones crecientes (0,30, 0,36, 0,43 y 0,51 mg/L) sobre larvas de *Rhinella spinulosa*, en un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas, se determinó el porcentaje de mortalidad, concentración letal media (CL_{50}) y la concentración de mercurio en las larvas muertas de dicha especie sometidos a 4 tiempos de exposición, el ensayo fue llevado a cabo en los laboratorios de Ecología y Control Ambiental-FCB-UNSCH, con un tipo de investigación básica – experimental utilizando recipientes de vidrio de 1 L de capacidad conteniendo 20 larvas. La alimentación en las larvas fue suspendida 24 horas antes del inicio del trabajo experimental en condiciones ambientales, temperaturas entre 14 y 21 °C, con pH entre 6.5 y 7.0. Se cuantificó la cantidad de larvas muertas a 24, 48, 72 y 96 horas para luego determinar el % de mortalidad, deduciendo que a mayor tiempo de exposición, el efecto toxicológico del cloruro de mercurio (HgCl_2) en las larvas es más letal, de la misma manera fue estimada la concentración letal media (CL_{50}) de HgCl_2 , de 0.588 mg/L en un periodo de 24 horas, 0.421 mg/L en 48 horas, 0.324 mg/L en 72 horas y 0.254 mg/L en un periodo de 96 horas,. Para determinar la cantidad de mercurio en las larvas muertas se utilizó el método EPA 245.7 (Espectrometría de Fluorescencia Atómica de Vapor Frío), dando como resultado, a 0.30 mg/L de HgCl_2 existe 0.0273 mg/L de Hg, a 0.36 mg/L de HgCl_2 , 0.0293 mg/L de Hg, 0.43 mg/L de HgCl_2 , 0.0652 mg/L de Hg y a 0.51 mg/L de HgCl_2 existe 0.0827 mg/L de Hg, mostrando estos resultados que permiten deducir que las larvas en estudio acumulan dicho metal.

Palabras clave: Contaminación, ecotoxicología, cloruro de mercurio, larvas, *Rhinella spinulosa*.

I. INTRODUCCIÓN

Entre las posibles causas del descenso de las poblaciones de anfibios en el mundo se señalan la alteración o destrucción de los hábitats naturales, la introducción de especies exóticas, las enfermedades infecciosas, la radiación ultravioleta, el calentamiento global y la presencia de sustancias químicas en el ambiente.¹

La minería artesanal de oro, ha favorecido el incremento de los ecosistemas acuáticos con mercurio (Hg), se calcula que, por cada kilogramo de oro, al menos 1,32 kg de Hg son vertidos al ambiente, ya que para amalgamar el oro se usa una relación Hg/Au de 6:1 y en algunos casos 10:1. No obstante, en áreas alejadas de las actividades mineras se ha estimado bajas concentraciones de mercurio en el agua entre 0 y 0,003 mg/L.²

Por su naturaleza el mercurio presenta alta persistencia en el ambiente, se bioacumula y biomagnifica y actúa como un disruptor endocrino en muy bajas concentraciones. El ingreso de mercurio a los anuros ocurre a través de la superficie del cuerpo por absorción directa desde el agua, consumo de sedimento, absorción del aire durante la respiración y a través de la cadena alimenticia.²

Una herramienta útil en la evaluación de contaminantes en hábitats acuáticos, es el uso de larvas de anuros como indicadores de efectos potenciales sobre el ecosistema por contaminación³. La historia de vida de los anuros exotróficos (terminan su desarrollo como renacuajos) puede ser aprovechada para medir el impacto por agentes contaminantes al ecosistema entero, pues aunque la contaminación por mercurio se da generalmente sobre el agua, estos animales son un vector para la contaminación hacia la tierra cuando terminan su desarrollo y dan una idea del impacto sobre una zona afectada⁴, adicionalmente, presentan una variedad de respuestas subletales, que pueden ser: comportamentales⁵, fisiológicas⁶ u ontogénicas⁷, las cuales a su vez desencadenan procesos de teratogénesis, como son la distensión de la cavidad corporal, ampollas, o

malformaciones, ya sea en el cuerpo o en el disco oral⁸, lo que brinda la posibilidad de monitorear los efectos del mercurio sobre las poblaciones.⁹

Aunque el Perú es rico en anfibios y estos organismos son considerados excelentes indicadores de la calidad del ambiente por la amplia variedad de respuestas a sustancias contaminantes¹⁰, las investigaciones en este tema en nuestro país son aún incipientes. Es por ello que se realizó pruebas de toxicidad del cloruro de mercurio (HgCl_2) en condiciones controladas, probado sobre larvas de *Rhinella spinulosa* en cuatro concentraciones, con la finalidad de determinar el efecto de la toxicidad aguda (mortalidad), y la concentración letal media (CL_{50}) a las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición, experimento que fue desarrollado, durante los meses de agosto y setiembre del año 2016, sobre la base de los siguientes objetivos.

Objetivo general

Evaluar el efecto toxicológico agudo del cloruro de mercurio en larvas de *Rhinella spinulosa* bajo condiciones de laboratorio.

Objetivos Específicos

- Determinar el porcentaje de mortalidad en larvas de *Rhinella spinulosa* en cuatro concentraciones de cloruro de mercurio, en un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas.
- Calcular la concentración letal media (CL_{50}) de cloruro de mercurio en larvas de *Rhinella spinulosa*, en 24, 48, 72 y 96 horas.
- Determinar la concentración de mercurio en las larvas muertas de *Rhinella spinulosa*, sometidas a cuatro concentraciones de cloruro de mercurio.

II. MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes

En larvas de anfibios expuestas a mercurio, se han identificado malformaciones, efectos negativos sobre la sobrevivencia, crecimiento y metamorfosis, cambios en el comportamiento y alteraciones en el sistema enzimático.^{7,11}

Una herramienta útil en la evaluación de contaminantes en hábitats acuáticos, es el uso de larvas de anuros como indicadores de efectos potenciales sobre el ecosistema por contaminación¹², la historia de vida de los anuros exotróficos (terminan su desarrollo como renacuajos) puede ser aprovechada para medir el impacto por agentes contaminantes al ecosistema entero, pues aunque la contaminación por mercurio se da generalmente sobre el agua, estos animales son un vector de la contaminación hacia la tierra cuando terminan su desarrollo y dan una idea del impacto sobre una zona afectada, adicionalmente, presentan una variedad de respuestas subletales, que pueden ser: comportamentales, fisiológicas u ontogénicas, las cuales a su vez desencadenan procesos de teratogénesis, como la distensión de la cavidad corporal, ampollas, o malformaciones, sea en el cuerpo o en el disco oral, lo que brinda la posibilidad de monitorear los efectos del mercurio sobre las poblaciones.¹³

Estudios reportan a las larvas de *Dendrosophus bogerti* como especie sensible al mercurio ya que demostraron efectos subletales, además, de ser de amplia distribución en el Valle de Aburrá y nativa para el departamento de Antioquia¹⁴, puede considerarse de mucha utilidad para evaluar la calidad del agua e integridad del ecosistema debido a la posición intermedia en las cadenas alimentarias.

El valor de la CL₅₀ de HgCl₂ en renacuajos de *Dendrosophus bogerti* (0,41 mg/l) indica que son más tolerantes al mercurio que los renacuajos de *Rana breviceps* (0,207 mg/l), *Rana pipens* (0,0073 mg/l) y *Bufo melanosticus* (0,056 mg/l)¹⁵, para el mismo período de exposición.

2.2. Marco Conceptual

2.2.1. Toxicidad

Es la capacidad de una sustancia de causar algún efecto nocivo sobre organismos vivos que depende de la cantidad administrada o absorbida, vía de ingreso al organismo, distribución a lo largo del tiempo después de su administración, naturaleza y severidad del daño producido, tiempo necesario para producir el efecto.¹⁶

2.2.2. Toxicidad aguda

Señala los efectos de una o de varias dosis administradas en 24 horas, pudiendo aparecer sus efectos en pocas horas o días.¹⁷

2.2.3 Toxico

Es el agente que puede producir un efecto adverso, daño referido a la estructura y función del sistema, donde la introducción puede ser deliberada (efluentes) o accidental (derrames). La cantidad liberada debe superar un nivel umbral para que se manifieste el efecto. Se establece la relación concentración / respuesta, duración de la exposición por medio de Ensayos de toxicidad.¹⁶

2.2.4. Efecto

Es el cambio biológico producido tanto en el nivel de organismo individual como en niveles de organización inferiores o superiores al individuo, asociado a la exposición al tóxico.¹⁸

2.2.5. Larvas

Son las fases juveniles de los animales con desarrollo indirecto (metamorfosis) y que tienen una anatomía, fisiología y ecología diferente del adulto.¹⁴

2.2.6. Metal pesado

Grupo de elementos de alta prioridad sanitaria, debido a su alta toxicidad sobre la mayoría de los organismos, a su ubicuidad y a que se pueden bioacumular a través de las cadenas tróficas en ecosistemas acuáticos y terrestres.⁹

2.2.7. Concentración letal media (CL₅₀)

Concentración obtenida por estadística de una sustancia que produzca la muerte del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado.¹⁶

2.2.8. Bioensayo

Método para evaluar la potencia relativa de un agente sobre organismos vivos, mediante la comparación del efecto del agente con el de una solución patrón o "Standard".¹⁹

2.3. Bases Teóricas

2.3.1. Toxicología

Ciencia que estudia los venenos (toxikon = veneno), es decir, las sustancias capaces de producir efectos nocivos sobre los seres vivos.¹⁶

Todas las sustancias son potencialmente tóxicas ya que pueden causar daños e incluso la muerte después de una exposición excesiva. Por otro lado, la mayoría pueden ser usadas de forma segura si se toman las precauciones para que la exposición esté por debajo de unos límites tolerables y se manejan con precauciones apropiadas.⁶

En la sociedad moderna, la toxicología es ya un elemento importante de la salud ambiental y de la salud en el trabajo. Ello es así porque muchas organizaciones, tanto gubernamentales como no gubernamentales, utilizan la información toxicológica para evaluar y regular los peligros presentes tanto en el lugar de trabajo como en el medio ambiente general.¹⁶

La toxicología es un componente crucial de las estrategias de prevención, pues proporciona información sobre peligros potenciales en los casos en que no hay una exposición humana amplia.¹⁷

2.3.2. Toxicidad

Capacidad inherente de una sustancia química de producir efectos adversos en los organismos vivos. Efectos de deterioro de tipo funcional, lesiones patológicas que afectan el funcionamiento del organismo y reducen su capacidad de respuesta a factores de riesgo o estrés.¹⁸

Sin embargo, una definición más exacta requiere la utilización de límites cuantitativos de contenido de sustancias tóxicas el uso de definiciones que establecen la CL₅₀ (concentración letal media que mata al 50% de los organismos de laboratorio).¹⁹

El efecto tóxico es el producido por uno o varios agentes tóxicos sobre un organismo, población o comunidad que se manifiesta por cambios biológicos. Su grado se evalúa por una escala de intensidad o severidad y su magnitud está relacionada con la dosis (cantidad de sustancia administrada, expresada generalmente por unidad de peso corporal) o la concentración (sustancia aplicada en el medio) del agente tóxico.²¹

2.3.3. Dosis letal media (DL₅₀) y concentración letal media (CL₅₀)

La dosis letal media (DL₅₀), dosis individual de una sustancia que provoca la muerte del 50% de la población animal debido a la exposición a la sustancia por

cualquier vía distinta a la inhalación, se utiliza para encontrar umbrales de toxicidad para determinadas sustancias.¹⁹

La concentración letal media (CL_{50}), concentración obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte durante la exposición o en un plazo definido después de ésta el 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado. El valor de la CL_{50} se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen de aire normal (mg/L).²²

2.3.4. Indicadores de Toxicología

Las siguientes unidades de medida expresan los valores de concentración de contaminantes y las dosis recibidas por un organismo, sirviendo como indicadores.²³

- **Dosis letal media (DL_{50}):** Dosis individual de una sustancia que provoca la muerte del 50% de la población animal debido a la exposición a la sustancia por cualquier vía distinta a la inhalación. Normalmente expresada como miligramos o gramos de material por kilogramo de peso del animal.
- **Concentración letal media (CL_{50}):** Concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado. El valor de la CL_{50} se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen de aire normal (mg/L).
- **Concentración efectiva (CE_{50}):** Concentración del tóxico que produce efectos negativos apreciables en el 50 por ciento de la población (pérdida del equilibrio, frecuencia respiratoria, en un tiempo determinado).
- **CL_{50} asintótica** Concentración de tóxico a la cual CL_{50} llega hacerse constante para un tiempo de exposición prolongado.
- **Concentración de efectos no observados (CENO):** La mayor concentración a la cual no se observa reacción crónica alguna en las especies ensayadas.
- **Concentración de efectos mínimos observables (CEMO):** La menor concentración de tóxico a la cual puede observarse algún efecto sobre la especie ensayada.
- **Nivel de efectos agudos no observados (NEANO):** Es la mayor concentración del tóxico para la cual la mortalidad registrada es del 10% o inferior.

- **Partes por millón (ppm):** Para determinar la concentración de una sustancia química en un volumen se utilizan las partes por millón de partes iguales. Cada millonésima parte de este volumen, correspondiente a la sustancia de nuestro interés, se considera una parte por millón de la sustancia. Las ppm se utilizan para determinar concentraciones muy pequeñas de gases en la atmósfera.
- **Efectos:** Es el cambio biológico producido tanto en el nivel de organismo individual como en niveles de organización inferiores o superiores al individuo, asociado a la exposición del tóxico.
- **Efecto agudo:** Corto tiempo de exposición (horas, días) donde la severidad es la mortalidad y se determina la concentración que causa la mortalidad del 50% de la población expuesta (CL₅₀).
- **Efecto letal:** Causa la muerte por acción directa como consecuencia de la exposición a una determinada concentración del agente tóxico.
- **Efecto subletal:** Se produce por debajo del nivel que causa la muerte directamente, como resultado de la exposición a una determinada concentración del agente tóxico.
- **Respuesta:** Proporción de la población expuesta al tóxico que manifiesta el efecto definido.

2.3.5. Ecotoxicología

El término ecotoxicología fue propuesto por Truhaut²⁴, como una extensión natural de la toxicología como la ciencia que estudia los efectos de las sustancias tóxicas sobre los organismos individuales, refiriéndose a dos efectos ecológicos importantes de los contaminantes:

- La toxicidad directa sobre los organismos
- Las alteraciones del medio ambiente en el cual viven los organismos.

De manera general, esta disciplina se encarga del estudio de los efectos adversos de las sustancias en los ecosistemas, mediante el análisis de las rutas de exposición, la entrada al organismo y efectos nocivos en individuos, poblaciones y comunidades. La diferencia más importante entre la ecotoxicología y la toxicología convencional es que en la primera los efectos que importan son los que ocurren sobre las poblaciones y no sobre los individuos. Desde una perspectiva ecotoxicológica, el hecho de que un contaminante pueda matar al 50% de los individuos de una población puede significar poco o nada, pero si ese contaminante retarda el desarrollo o madurez de un número importante de individuos pueden presentarse importantes alteraciones ecológicas. De la misma

manera, si un contaminante modifica las condiciones del medio en que habitan los organismos, las consecuencias ecológicas pueden ser considerables. Se puede decir que la ecotoxicología se encarga del estudio de las relaciones directas e indirectas entre las causas, los impactos sobre los individuos y las alteraciones finales sobre las poblaciones y las comunidades.

2.3.6. Bioensayos

Se entiende por bioensayo, un ensayo en que un tejido, organismo o grupo de organismos vivos se usan como reactivo para determinar la potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa cuya actividad se desconoce.

Los bioensayos, o pruebas de toxicidad son experimentos que miden el efecto de uno o más contaminantes en una o más especies ²⁵, permiten evaluar el grado de toxicidad de una sustancia química, un efluente, un cuerpo de agua, etc., empleando organismos vivos ²⁶. Puede determinarse la influencia relativa de cada factor sobre los parámetros biológicos estudiados. Los rangos de variación de los factores considerados pueden ser mayores que los existentes en el ambiente natural, lo que muchas veces facilita el estudio de su modo de acción. También pueden estudiarse combinaciones de dos o más factores, lo que permite revelar la existencia de antagonismos o sinergismos entre ellos. La posibilidad de controlar muchas de las variables hace posible la eliminación de las fluctuaciones propias de las condiciones naturales, que generalmente oscurecen o interfieren con la finalidad principal del estudio llevado a cabo.²⁶

Para proteger el medio acuático es necesario fijar límites superiores a las descargas de contaminantes perjudiciales químicos y físicos, además de vigilar y regular las descargas que se realicen posteriormente. Los límites superiores de las descargas se derivan de la consideración de los criterios apropiados de calidad de agua formulados a partir de datos de respuestas para sistemas biológicos (bioensayos crónicos o agudos).

Los individuos son expuestos a concentraciones crecientes del tóxico para determinar cambios en el organismo. En general la muerte es el criterio más utilizado en la prueba de CL₅₀ horas. Uno o más controles son utilizados en organismos expuestos a similares condiciones excepto cuando existe falta de disponibilidad del tóxico²⁸. Los bioensayos toxicológicos tienen por finalidad determinar las concentraciones de un tóxico dado que ocasionen efectos dañinos o nocivos en un organismo modelo. Estos efectos pueden incluirse en las siguientes categorías:

- Afectación del término de vida
- Alteración de la tasa de crecimiento
- Cambios de los parámetros reproductivos

Cuando se produce algún efecto se anota el efecto y la concentración del compuesto químico. Si el organismo de prueba muere se anota la concentración letal, esta es la manera por la cual se determina en un laboratorio la toxicidad de un compuesto químico, puede ocurrir que a bajas concentraciones de un compuesto químico muchos de los animales de prueba mueran, esto significa que el compuesto en cuestión es muy tóxico. Cuando sabemos cómo de tóxico es un compuesto, también sabemos los efectos de este compuesto cuando una cierta concentración se presenta en una zona.

2.3.7. Metales Pesados

La denominación metal pesado, a pesar de ser controvertida, por imprecisa, es empleada ampliamente en el ámbito científico. Los elementos comprendidos bajo esta denominación presentan como característica en común una elevada densidad¹⁴. Según la definición más difundida, metal pesado es aquel elemento que tiene una densidad igual o superior a 5 g/cm³ cuando está en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino térreos) que en concentraciones bajas pueden dañar los seres vivos y tienden a acumularse en la cadena alimentaria. Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1% y casi siempre menor del 0,01%. Junto a estos metales pesados existen otros elementos químicos que, aunque son metales ligeros o no metales, se suelen englobar con ellos por presentar orígenes y comportamientos asociados; es éste el caso del arsénico, boro, bario y selenio.

2.3.7.1. El Mercurio

El mercurio es único entre los metales, es un denso líquido plateado a temperatura ambiente, tiene un punto de fusión de -39°C, un punto de ebullición de 357°C, una densidad relativa de 13.5 g/mL y una masa atómica de 200.6 g/mol. Este elemento existe en tres estados de oxidación, mercurio elemental o metálico (Hg⁰), mercurioso (Hg¹⁺) y mercúrico (Hg²⁺).²⁹

a. Ciclo de Mercurio

El mercurio en el ambiente es constantemente recirculado a través de su ciclo biogeoquímico. El ciclo consta de varios pasos:

- Desgasificación del mercurio de rocas, suelo y superficie de agua; o emisión de fuentes antropogénicas.

- Movimiento en forma gaseosa a través de la atmósfera.
- Oxidación de mercurio gaseoso (Hg^0) a mercurio reactivo o divalente (Hg^{2+}) y su posterior deposición en la tierra o sobre la superficie del agua.
- Precipitación o bioconversión en formas más volátiles o solubles como metilmercurio (CH_3Hg^+).
- Reentrada a la atmósfera o bioacumulación en la cadena alimenticia.

El ciclo de mercurio en el ambiente se da como resultado de fuentes naturales o debida a actividades antropogénicas, ambas emisiones contribuyen a la reserva mundial de mercurio.³⁰

a. Usos del mercurio

Por ser el único metal líquido, se utiliza en un gran número de productos y procesos que aprovechan sus singulares características.³¹

Como metal se utiliza:

- Para extracción de oro y plata.
- Como catalizador en la industria cloro alcalina.
- En manómetros para medir y controlar la presión.
- En termómetros.
- En interruptores eléctricos y electrónicos.
- En lámparas fluorescentes.
- En las amalgamas dentales.

Como compuestos químicos:

- En baterías.
- Biocidas en la industria del papel y pinturas.
- Catalizadores.
- Como antiséptico en productos farmacéuticos.
- Explosivos.
- Pigmentos y colorantes.
- Reactivos para análisis de laboratorio.

b. Fuentes de mercurio

Las emisiones naturales de mercurio provienen de la desgasificación de la corteza terrestre a través de los gases volcánicos que alcanzan niveles de 25,000 y 125,000 toneladas anuales, así como por la evaporación de los océanos. Existen grandes yacimientos de mercurio en zonas de actividad volcánica como son el Cinturón de Fuego, la Cordillera del Pacífico Oriental, el Arco Mediterráneo, el Himalaya y la Cordillera Mesoatlántica.²

Por otro lado, las aportaciones de mercurio antropogénicas han excedido el aporte natural desde el inicio del periodo industrial. Aproximadamente el 80% de las fuentes antropogénicas de mercurio son emisiones de mercurio elemental al aire de la quema de combustible fósil, minería, fundición y quema de residuos sólidos; el carbón puede contener cantidades traza de mercurio en forma natural (0.04 - 0.7 mg/kg).²⁹

c. El mercurio en el medio ambiente acuático

El medio ambiente acuático es un medio vulnerable a la contaminación debido a su elevado poder disolvente para una amplia gama de productos de desecho, a su vez es un vehículo excelente para la evacuación de materiales de diversa índole, tanto en estado líquido, sólido o gaseoso. Las aguas continentales tanto superficiales como subterráneas, se convierten en el medio a través del cual se realiza el drenaje de restos de la degradación del medio, ocasionados ya sea por causas naturales (como son productos de erosión o la disolución de materiales de la corteza terrestre y por la descomposición de los seres vivos), o por causas antropogénicas como producto de las actividades humanas.³⁰

El metilmercurio (CH_3Hg^+), es la forma más tóxica del mercurio que se produce cuando cualquier forma de mercurio es metilada en ecosistemas acuáticos, ya sea por procesos bióticos (bacterias) o procesos puramente químicos.

Cuando el mercurio se encuentra presente en la atmósfera precipita con la lluvia, puede llegar a los cuerpos de agua superficiales como lagos y arroyos, o al mar. Cuando precipita como deposición seca, puede eventualmente ser lavado a esos cuerpos de agua por la lluvia. Las bacterias presentes en estos medios, así también como reacciones estrictamente químicas, convierten el mercurio a metilmercurio (CH_3Hg^+), de esta forma es incorporado por las plantas y animales acuáticos³¹. Los peces que comen estos organismos acumulan metilmercurio (CH_3Hg^+) en sus cuerpos. Los peces grandes al comer a los más pequeños concentran el metilmercurio (CH_3Hg^+) y así va subiendo y acumulándose en la cadena trófica (alimentaria). Este proceso se llama bioacumulación y biomagnificación.³²

Las concentraciones de metilmercurio (CH_3Hg^+) dependen de varios factores, incluyendo la concentración de mercurio en el agua, su pH y temperatura, la cantidad de sólidos orgánicos disueltos, y de la dieta de los organismos en el medio acuático. Las concentraciones de metilmercurio (CH_3Hg^+) en los peces pueden ser afectadas por la presencia de sulfuro y otros químicos contenidos en

el agua, debido a estas variables, y por la complejidad de las redes alimentarias, la bioacumulación es difícil de predecir y puede variar de un cuerpo acuático a otro.³³

Sin embargo, en un determinado cuerpo acuático, la mayor concentración de metilmercurio (CH_3Hg^+) generalmente se encuentra en peces grandes que comen otros peces más pequeños.

2.3.8. Orden Anura: Familia Bufonidae

Los bufónidos (Bufonidae) son una familia del orden Anura, perteneciente a la clase de los anfibios. Muchas de sus especies se conocen con el nombre común de sapos. Los bufónidos carecen de dientes y tienen glándulas parotoides en la parte trasera de su cabeza, estas glándulas contienen diferentes toxinas que tienen diferentes efectos.³⁴

Como todos los anuros, sufren una metamorfosis durante su desarrollo, comienzan su vida como renacuajos con su cuerpo similar a un pez, sin patas y respirando a través de las branquias, durante su metamorfosis, aparecen las patas, desaparece la cola y la respiración pasa a ser pulmonar.³⁵

a. Distribución geográfica

Se distribuye en las laderas y valles de Los Andes de Argentina, Bolivia, Chile y Perú, por sobre los 1500 m de altitud.³⁶

b. Taxonomía

La *Rhinella spinulosa* se encuentra dentro de la siguiente clasificación.¹

Reino : Animalia

Filo : Chordata

Clase : Amphibia

Orden : Anura

Familia: Bufonidae

Género: *Rhinella*

Especie: *R. spinulosa*. Wiegmann, 1834

c. Hábitat

En los andes la especie está presente en matorrales y pastizales, y en las partes más meridionales de su área de distribución se encuentra en áreas boscosas, también se ha registrado en las zonas cultivables, la cría tiene lugar en la estación húmeda en estanques temporales, lagunas de altiplano y arroyos de flujo lento; no se han encontrado renacuajos durante la estación seca.³⁶

d. Ciclo de vida

Durante el periodo reproductivo, los anuros machos de la mayoría de los anfibios cantan para atraer a las hembras, este canto se denomina de cortejo o nupcial y es característico de cada una de las especies. El apareamiento de anfibios se denomina amplexo o abrazo copulatorio. Las hembras depositan los huevos en pozas temporales, lagunas, etc., donde serán fecundados posteriormente. De los huevos eclosionan las larvas con branquias y cola. Al final de la etapa larvaria ocurre la metamorfosis: aparecen las extremidades, la cola comienza a acortarse hasta desaparecer (autodigestión).⁷

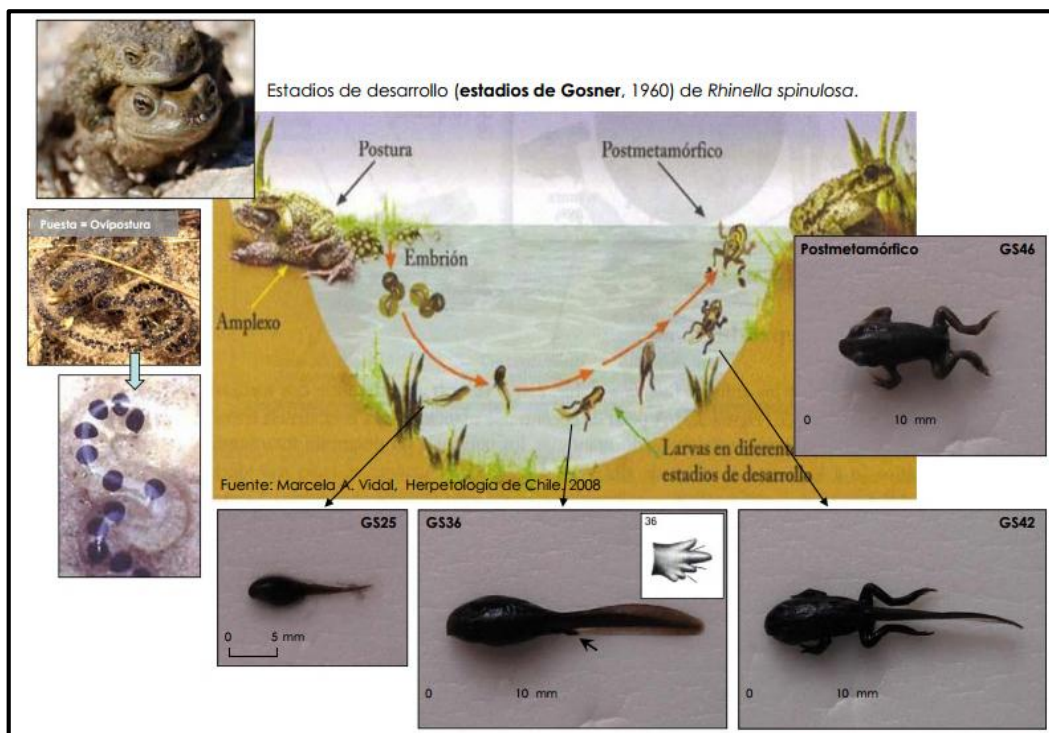


Figura 1: Estadios de desarrollo de *Rhinella spinulosa*. Wiegmann, 1834.

e. Principales amenazas actuales y potenciales

Veloso y Núñez³⁷, señalan que no existen evidencias de amenazas para esta especie; aunque si la sobre captura con fines educativos (disecciones), así como la construcción de centrales hidroeléctricas, actividades mineras y contaminación de las aguas serían factores de preocupación.

Mella³⁸, señala que los principales factores de mortalidad, serían naturales debido a factores físico químicos, desecación, aumento de la temperatura y descomposición de la materia orgánica de las pozas en que oviponen las hembras y luego se desarrollan las larvas.

f. Estado de conservación

La especie ha sido clasificada como una especie de Preocupación Menor, ya que al ser evaluado no se ajusta a las categorías de amenaza o cercana de la amenaza por ser un taxón abundante y de amplia distribución.³⁶

2.4. Marco legal

2.4.1. Estándares de calidad ambiental para agua (D.S. 004-2017 MINAM)

En los Estándares de Calidad Ambiental para Agua, la Categoría 4 «Conservación del ambiente acuático», indica que los ríos deben tener y mantener los parámetros definidos en la categoría 4 y en caso contrario, las acciones de recuperación deben orientarse a obtener dicha calidad.

Tabla 1. Estándares de Calidad Ambiental para Agua.
Categoría 4 <Conservación del ambiente acuático>

Parámetros	Unidad de medida	E1: Lagunas y lagos	E2: Ríos		E3: Ecosistemas costeros y marinos	
			Costa y sierra	Selva	Estuarios	Marinos
FÍSICOS - QUÍMICOS						
Aceites y Grasas	mg/L	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Cianuro Libre	mg/L	0,0052	0,0052	0,0052	0,00	0,001
Color (b)	Color verdadero	20 (a)	20 (a)	20 (a)	**	**
Clorofila A	mg/L	0,008	**	**	**	**
Conductividad	(μ S/cm)	1 000	1 000	1 000	**	**
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	mg/L	5	10	10	15	10
Fenoles	mg/L	2,56	2,56	2,56	5,8	5,8
Fósforo total	mg/L	0,035	0,05	0,05	0,12	0,062
Nitratos (NO ₃ ⁻) (c)	mg/L	13	13	13	200	200
Amoniaco Total	mg/L	(1)	(1)	(1)	(2)	(2)
Nitrógeno Total	mg/L	0,315	**	**	**	**
Oxígeno Disuelto	mg/L	≥ 5	≥ 5	≥ 5	≥ 4	≥ 4
Potencial de	Unidad de	6,5 a	6,5 a 9,0	6,5 a 9,0	6,8 – 8,5	6,8 – 8,5
Sólidos	mg/L	≤ 25	≤ 100	≤ 400	≤	≤ 30
Sulfuros	mg/L	0,002	0,002	0,002	0,00	0,002
Temperatura	°C	Δ 3	Δ 3	Δ 3	Δ 2	Δ 2
INORGÁNICOS						
Antimonio	mg/L	0,64	0,64	0,64	**	**
Arsénico	mg/L	0,15	0,15	0,15	0,03	0,036
Bario	mg/L	0,7	0,7	1	1	**
Cadmio Disuelto	mg/L	0,00025	0,00025	0,00025	0,00	0,0088
Cobre	mg/L	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05
Cromo VI	mg/L	0,011	0,011	0,011	0,05	0,05
Mercurio	mg/L	0,0001	0,0001	0,0001	0,00	0,0001
Níquel	mg/L	0,052	0,052	0,052	0,00	0,0082
Plomo	mg/L	0,0025	0,0025	0,0025	0,00	0,0081
Selenio	mg/L	0,005	0,005	0,005	0,07	0,071
Talio	mg/L	0,0008	0,0008	0,0008	**	**
Zinc	mg/L	0,12	0,12	0,12	0,08	0,081
ORGÁNICOS						
Compuestos Orgánicos Volátiles						

Hidrocarburos Totales de	mg/L	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Hexaclorobutadieno	mg/L	0,0006	0,0006	0,0006	0,00	0,0006
BTEX						
Benceno	mg/L	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Hidrocarburos Aromáticos						
Benzo(a)Pireno	mg/L	0,0001	0,0001	0,0001	0,00	0,0001
Antraceno	mg/L	0,0004	0,0004	0,0004	0,00	0,0004
Fluoranteno	mg/L	0,001	0,001	0,001	0,00	0,001
Bifenilos Policlorados						
Bifenilos	mg/L	0,00001	0,000014	0,000014	0,00003	0,00003
PLAGUICIDAS						
Organofosforados						
Malatión	mg/L	0,0001	0,0001	0,0001	0,00	0,0001
Paratión	mg/L	0,00001	0,000013	0,000013	**	**
Organoclorados						
Aldrin	mg/L	0,00000	0,000004	0,000004	**	**
Clordano	mg/L	0,00000	0,0000043	0,0000043	0,000004	0,000004
DDT (Suma de 4,4'-DDD y 4,4'-DDE)	mg/L	0,000001	0,000001	0,000001	0,000001	0,000001
Dieldrin	mg/L	0,00005	0,000056	0,000056	0,0000019	0,000001
Endosulfán	mg/L	0,00005	0,000056	0,000056	0,0000087	0,000008
Endrin	mg/L	0,00003	0,000036	0,000036	0,0000023	0,000002
Heptacloro	mg/L	0,00000	0,0000038	0,0000038	0,0000036	0,000003
Heptacloro Epóxido	mg/L	0,00000	0,0000038	0,000	0,00	0,000003
Lindano	mg/L	0,00095	0,00095	0,000	**	**
Pentaclorofenol	mg/L	0,001	0,001	0,001	0,00	0,001
Carbamato						
Aldicarb	mg/L	0,001	0,001	0,001	0,00	0,00015
MICROBIOLÓGICO						
Coliformes	NMP/100	1 000	2 000	2 000	1	2 000

Fuente: D.S. N° 004-2017- MINAM

La Organización Mundial de la Salud ha establecido el valor de 0,001 mg/L para mercurio en agua potable pero el principal riesgo de la contaminación por mercurio de las aguas, es por el consumo de peces contaminados, que acumulan la cantidad de mercurio que ingieren a través de la cadena trófica.

2.4.2. Límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades minero – metalúrgicas

Medida de la concentración o del grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos, que caracterizan al efluente líquido de actividades minero-metalúrgicas, ya que al ser excedido causa o puede causar daños a la salud, al bienestar humano y al ambiente. Su cumplimiento es exigible legalmente por el Ministerio del Ambiente y los organismos que conforman el sistema de gestión ambiental.

Tabla 2. Límites Máximos Permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades Minero-Metalúrgicas.

Parámetro	Unidad	Límite en cualquier momento	Límite para el promedio anual
pH		6 - 9	6 - 9
Sólidos totales en suspensión	mg/L	50	25
Aceites y grasas	mg/L	20	16
Cianuro Total	mg/L	1	0,8
Arsénico Total	mg/L	0,1	0,08
Cadmio Total	mg/L	0,05	0,04
Cromo Hexavalente (*)	mg/L	0,1	0,08
Cobre Total	mg/L	0,5	0,4
Hierro (Disuelto)	mg/L	2	1,6
Plomo Total	mg/L	0,2	0,16
Mercurio Total	mg/L	0,002	0,0016
Zinc Total	mg/L	1,5	1,2

Fuente: D.S. N° 010-2010 MINAM

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Ubicación del lugar de muestreo

Departamento: Ayacucho

Provincia : Huamanga

Distrito : Ayacucho

Zona : Huatatas

La ubicación geográfica de la zona de muestreo de *Rhinella spinulosa* estuvo a una altitud de 2636 msnm (Anexo 7), que fue determinado con un equipo de posicionamiento satelital. El lugar donde se realizó el trabajo experimental fue el Laboratorio de Ecología y Control Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH, a 2876 msnm.

3.2. Población y muestra biológica

3.2.1. Población

Larvas de *Rhinella spinulosa* del río Huatatas.

3.2.2. Muestra

400 larvas de *Rhinella spinulosa*.

3.2.3. Unidad experimental

Recipientes de vidrio de 1 litro de capacidad, conteniendo 20 larvas de *Rhinella spinulosa*.

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Colecta de las larvas de *Rhinella spinulosa*

La recolección de las larvas de *Rhinella spinulosa*, fue realizada en el río Huatatas a una altitud de 2636 msnm, haciendo uso de una red de boca circular de 30 cm de diámetro, durante el mes de agosto del año 2017 para su posterior traslado al laboratorio de Ecología y Control Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH, en un balde de 4L de plástico, posteriormente para la aclimatación se colocó en una bandeja de plástico a partir del cual se realizó la selección de larvas mediante el empleo de un sifón de jebe, cuidando no maltratarlos.

3.3.2. Selección y mantenimiento de las larvas para bioensayos

Las larvas colectadas de *Rhinella spinulosa*, antes de dar inicio al experimento fueron mantenidas en una bandeja de plástico transparentes por un tiempo de 24 horas en agua potable declorada y no se les suministró alimento alguno. Las larvas empleadas en la prueba toxicológica, fueron aquellas que sobrevivieron al tiempo de mantenimiento, del estadio 26 de Gosner (1960), con una longitud de 1,5 a 2 cm, Los ejemplares que no mostraron movilidad activa, fueron descartados, quedando para el experimento aquellos que mostraron movilidad activa.

3.3.3. Preparación de las unidades experimentales

Para las unidades experimentales se utilizó el compuesto químico denominado cloruro de mercurio (HgCl_2) (Anexo 8), con el cual se preparó cuatro concentraciones crecientes, donde fueron colocadas las larvas empleadas como modelos biológicos, tal como se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 3. Características de las unidades experimentales según la concentración del cloruro de mercurio y el número de larva dispuesta en ellas.

Tipos de unidades experimentales	Concentración de HgCl_2 mg/L	Nº de individuos (larvas de <i>Rhinella spinulosa</i>)
1	0,30	20
2	0,36	20
3	0,43	20
4	0,51	20
Blanco	0	20

Las concentraciones del cloruro de mercurio (HgCl_2), para el presente trabajo de investigación se tomó como referencia el trabajo de Muñoz y Palacio⁴⁰, las larvas fueron asignadas a las unidades experimentales de manera aleatoria. Los recipientes de cría (unidades experimentales) estuvo constituida por recipientes de vidrio, con un litro de agua declarada con la respectiva concentración de cloruro de mercurio y a la vez acondicionado a una bomba electromagnética de aire de 5 salidas con mangueras de jebe de 1 mm de diámetro las mismas que estuvieron sujetas a piedras difusoras por cada recipiente asegurando así la presencia de oxígeno en el medio durante la realización del trabajo experimental (Anexo 10). Se consideró como inicio del experimento, cuando las larvas fueron colocados en los recipientes con las diferentes concentraciones, para luego realizar inspecciones minuciosas a las 24, 48, 72 y 96 horas, en la que se determinó el número de larvas muertas en cada recipiente, para lo cual nos ayudamos con una varilla de metal, si en caso de seguir inmóvil, fue considerado como muerto y fueron extraídos de las unidades experimentales.

3.4. Tipo de investigación

Básica – experimental

3.5. Diseño de investigación

El bioensayo está orientado a una investigación experimental de relación causal, con un diseño completamente al azar (DCA) de un solo factor, 5 niveles de tratamientos con 4 repeticiones y una variable de respuesta.

Factor: 1 solo factor

Tratamientos: 5 niveles (0.30, 0.36, 0.43, 0.51 mg/L de HgCl₂ y el blanco).

Variable de respuesta: Porcentaje que mortalidad

3.6. Análisis de datos

3.6.1. Determinación del porcentaje de mortalidad

El porcentaje de mortalidad se determinó, a través de la aplicación de la siguiente formula:

$$M = (n \times 100) / N$$

Donde:

M = Porcentaje de mortalidad

n = Número de larvas de *Rhinella spinulosa* muertas

N = Número total de larvas en el ensayo

Con los datos obtenidos de mortalidad se confeccionaron gráficas estadísticas del tipo descriptivo de tendencia central a las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición, para lo cual se empleó el programa Excel 2016, en caso del control no fue considerado para la representación gráfica, debido a que no se ha encontrado muerte de las larvas de *Rhinella spinulosa*, por lo tanto, el porcentaje de mortalidad representa 0%.

Para la determinación de la concentración letal media (CL₅₀), se empleó el método de Análisis Probit, para el HgCl₂ en 24, 48, 72 y 96 horas, con el software estadístico MINITAB 16.

$$Y = F(Z) = \int_{-\infty}^Z \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{z^2}{2}} dz$$

Donde:

Z = $\beta_1 + \beta_2 X_{2i}$

β_1 = constante

β_2 = Coeficiente de regresión del logaritmo de la concentración del HgCl₂

X_{2i} = Logaritmo de la concentración del HgCl₂

Y = % Mortalidad

3.6.2. Determinación de la concentración de mercurio en larvas de *Rhinella spinulosa*

Para la lectura de mercurio en las larvas muertas de *Rhinella spinulosa* por cada concentración preparada, se hizo el lavado de las larvas muertas para su posterior secado en un horno a 80 °C durante 4 días, después del tiempo transcurrido se molió la masa seca utilizando un mortero de porcelana y finalmente la masa obtenida se disolvió en agua destilada en un volumen de 300 ml cada uno, para su preservación se le agregó 5 gotas de ácido nítrico concentrado (HNO₃) por cada concentración preparada. Las muestras fueron enviadas al laboratorio acreditado NSF Envirolab donde se realizó el análisis por el método EPA Method 245.7 espectrofotométrico (Anexo 14, 15 y 16).

IV. RESULTADOS

Tabla 4. Promedio del porcentaje de mortalidad de *Rhinella spinulosa* expuestos a concentraciones de cloruro de mercurio en 24, 48, 72, y 96 horas en condiciones de laboratorio.

		Promedio del % de mortalidad acumulada a distintas horas de exposición			
		24	48	72	96
	0,30	0	16,3	41,3	72,5
Concentración	0,36	1,3	23,8	55	86,3
de HgCl₂ (mg/L)	0,43	12,5	48,7	91,3	100
	0,51	21,3	76,3	100	100
	Control	0	0	0	0

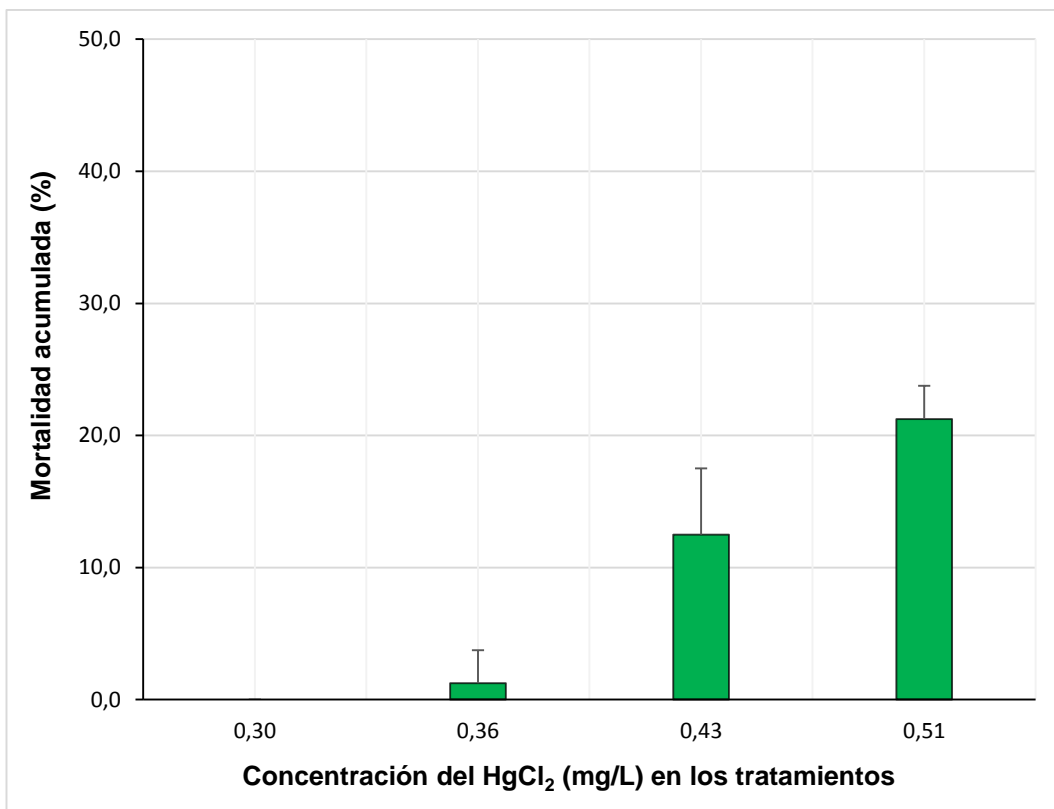


Figura 2. Mortalidad acumulada promedio y desviación típica de larvas de *Rhinella spinulosa* (Amphibia: Anura) causada por el cloruro de mercurio a las 24 horas de exposición.

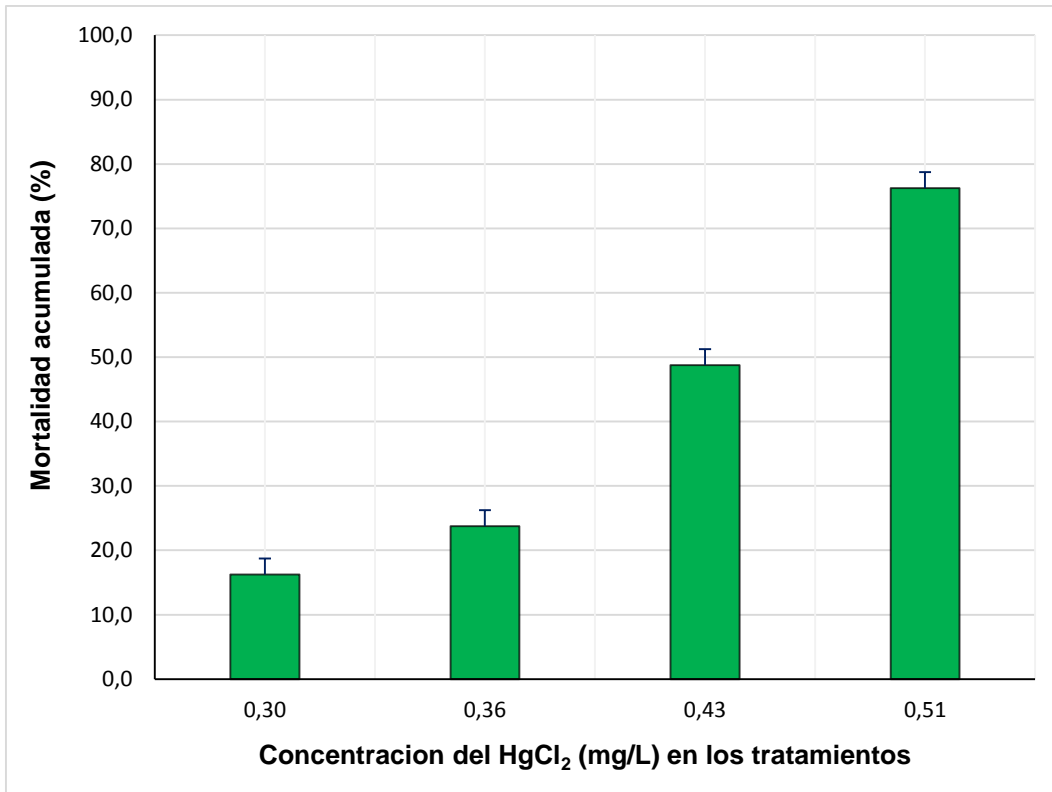


Figura 3. Mortalidad acumulada promedio y desviación típica de larvas de *Rhinella spinulosa* (Amphibia: Anura) causada por el cloruro de mercurio a las 48 horas de exposición.

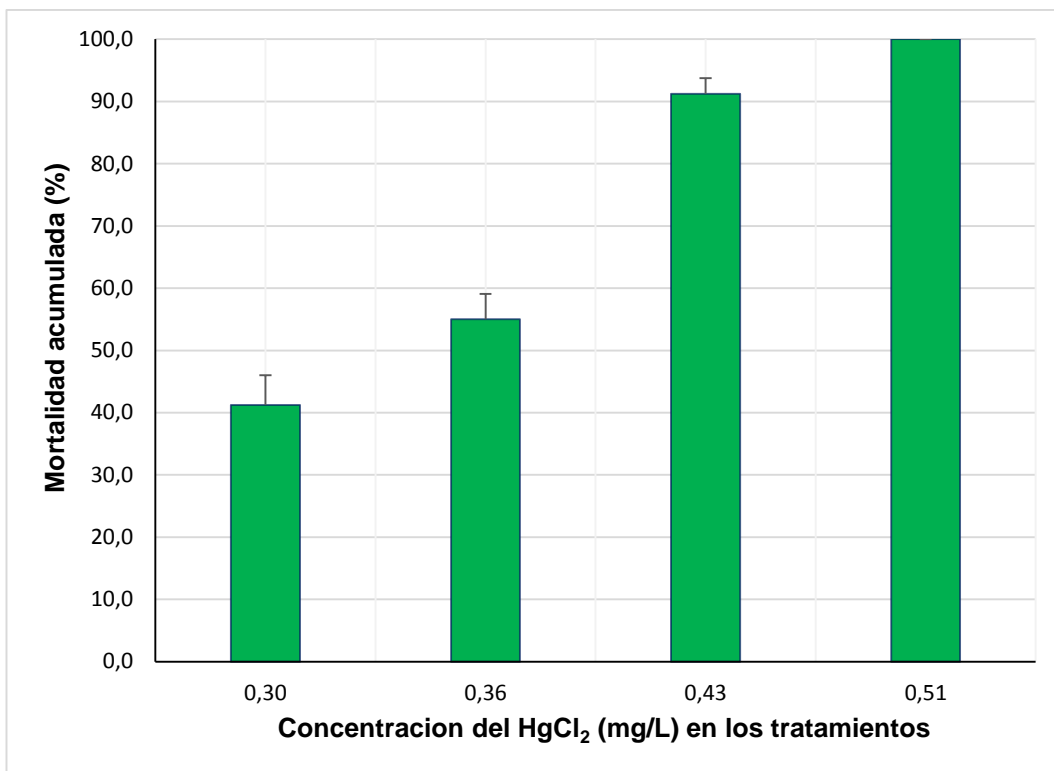


Figura 4. Mortalidad acumulada promedio y desviación típica de larvas de *Rhinella spinulosa* (Amphibia: Anura) causada por el cloruro de mercurio a las 72 horas de exposición.

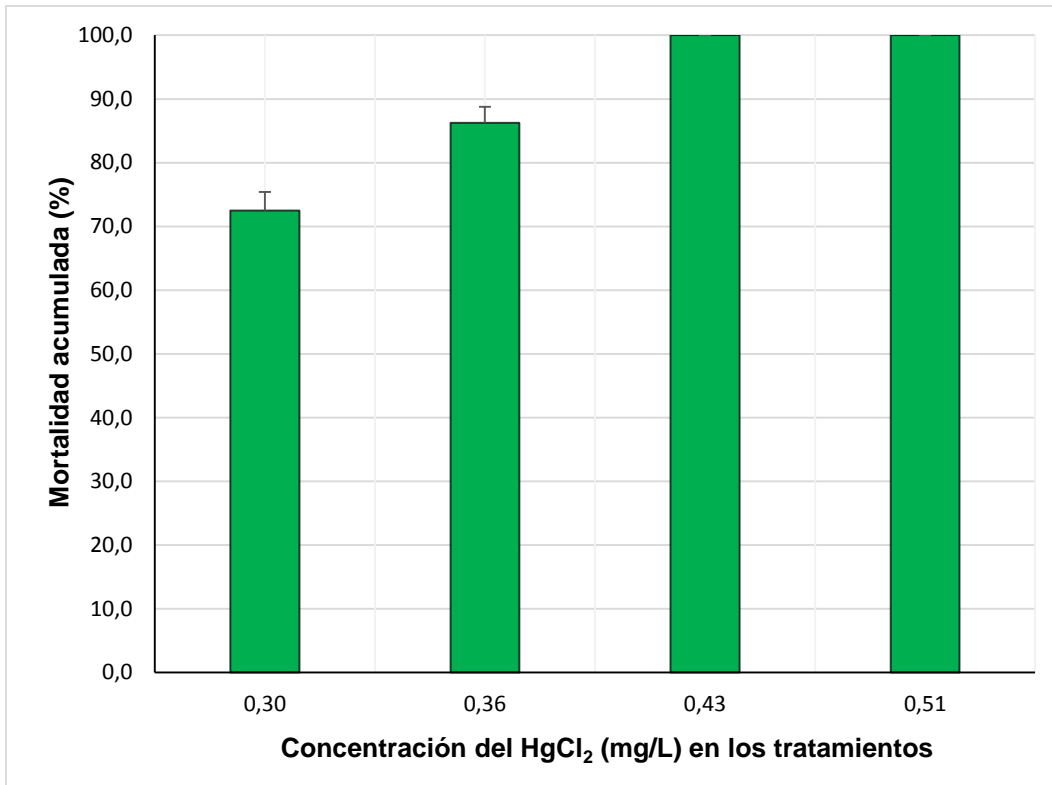


Figura 5. Mortalidad acumulada promedio y desviación típica de larvas de *Rhinella spinulosa* (Amphibia: Anura) causada por el cloruro de mercurio a las 96 horas de exposición.

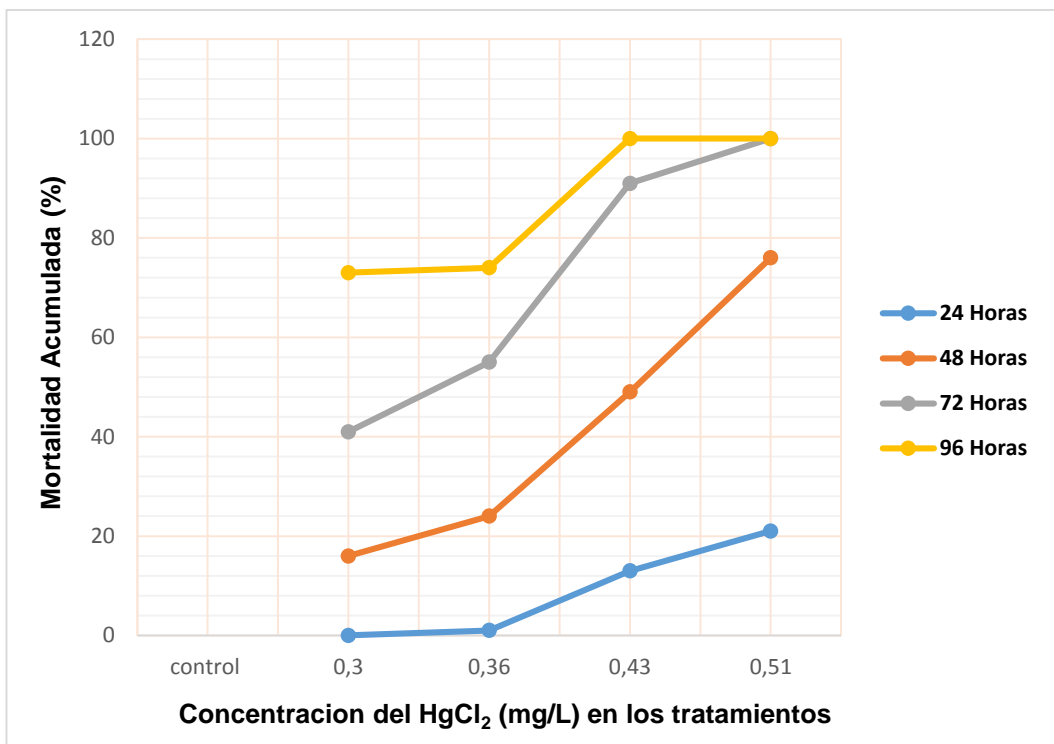


Figura 6. Mortalidad acumulada promedio de larvas de *Rhinella spinulosa* (Amphibia: Anura) causada por el cloruro de mercurio a diferentes horas de exposición.

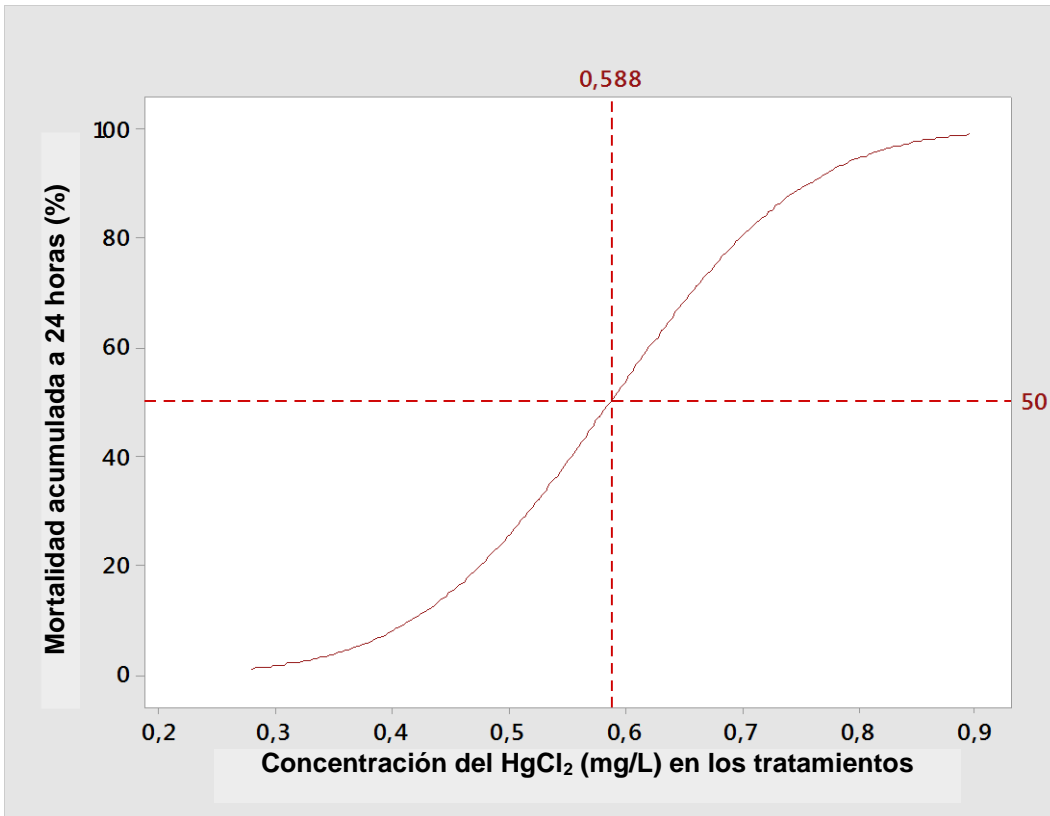


Figura 7. Tendencia del porcentaje de mortalidad acumulada calculada por Probit y concentración letal media del cloruro de mercurio sobre larvas de *Rhinella spinulosa* (Amphibia: Anura) a 24 horas de exposición.

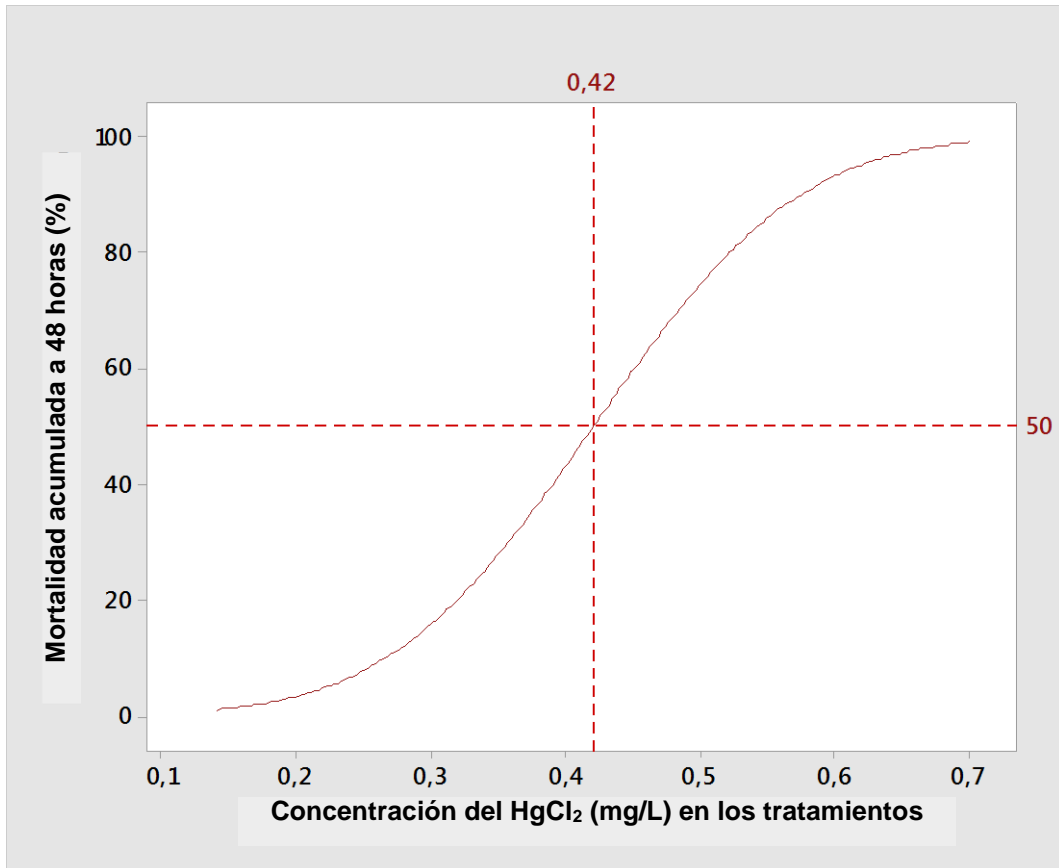


Figura 8. Tendencia del porcentaje de mortalidad acumulada calculada por Probit y concentración letal media del cloruro de mercurio sobre larvas de *Rhinella spinulosa* (Amphibia: Anura) a 48 horas de exposición.

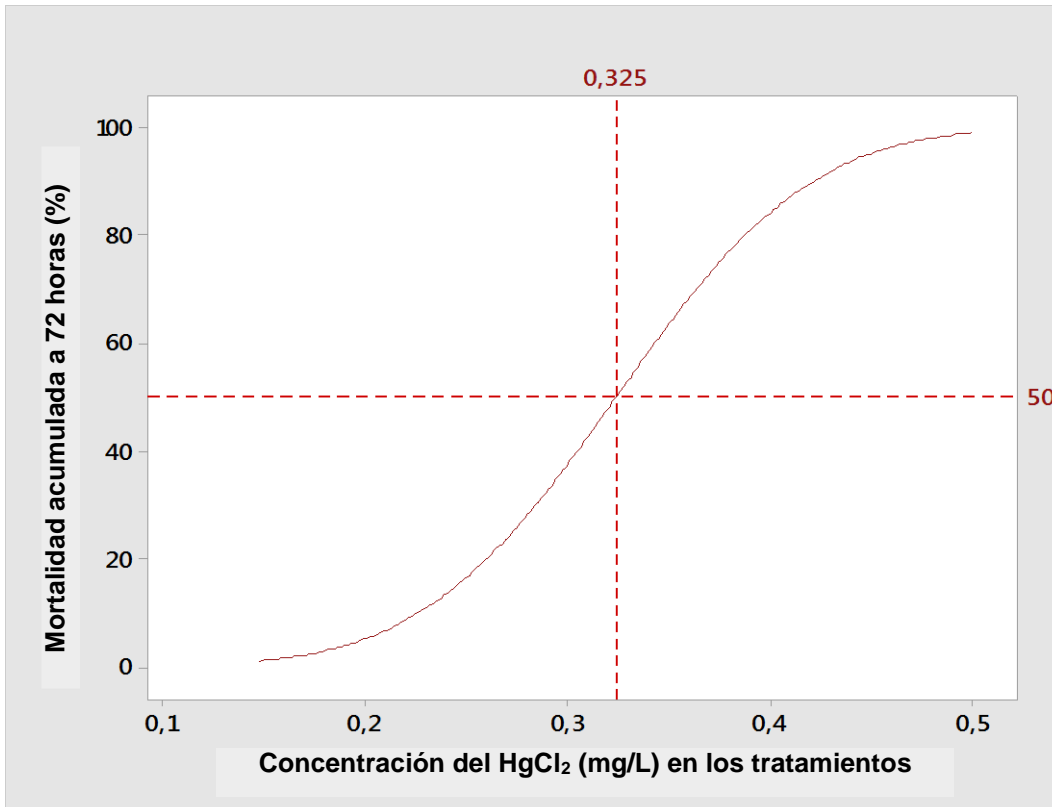


Figura 9. Tendencia del porcentaje de mortalidad acumulada calculada por Probit y concentración letal media del cloruro de mercurio sobre larvas de *Rhinella spinulosa* (Amphibia: Anura) a 72 horas de exposición.

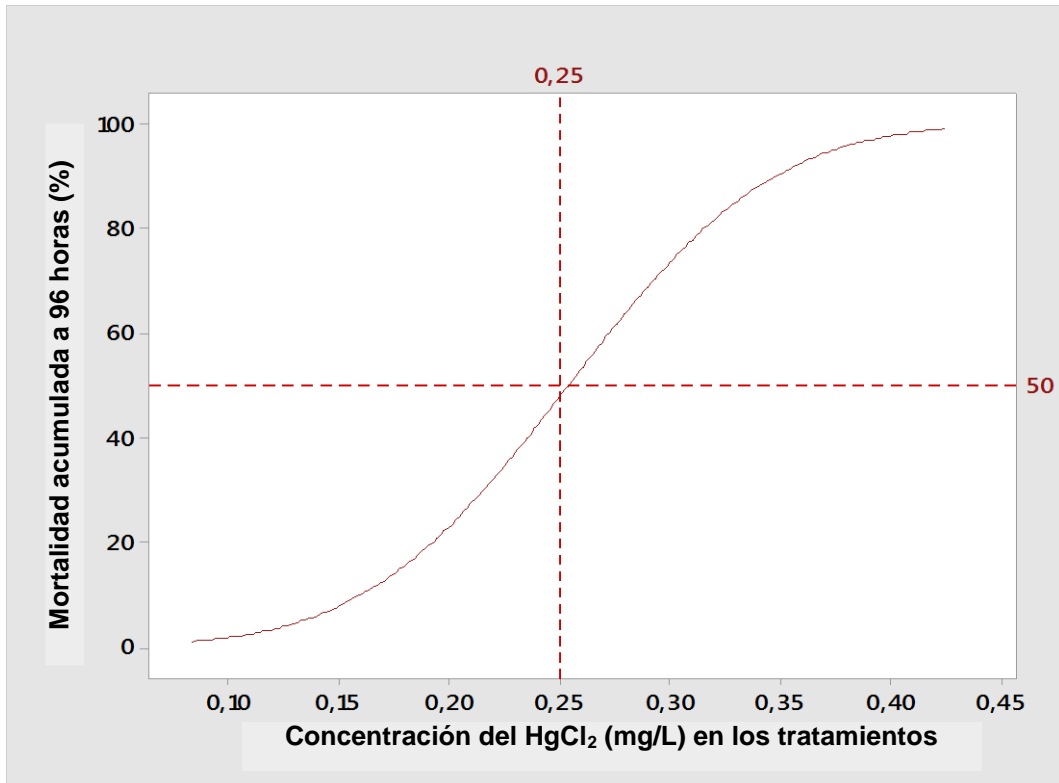


Figura 10. Tendencia del porcentaje de mortalidad acumulada calculada por Probit y concentración letal media del cloruro de mercurio sobre larvas de *Rhinella spinulosa* (Amphibia: Anura) a 96 horas de exposición.

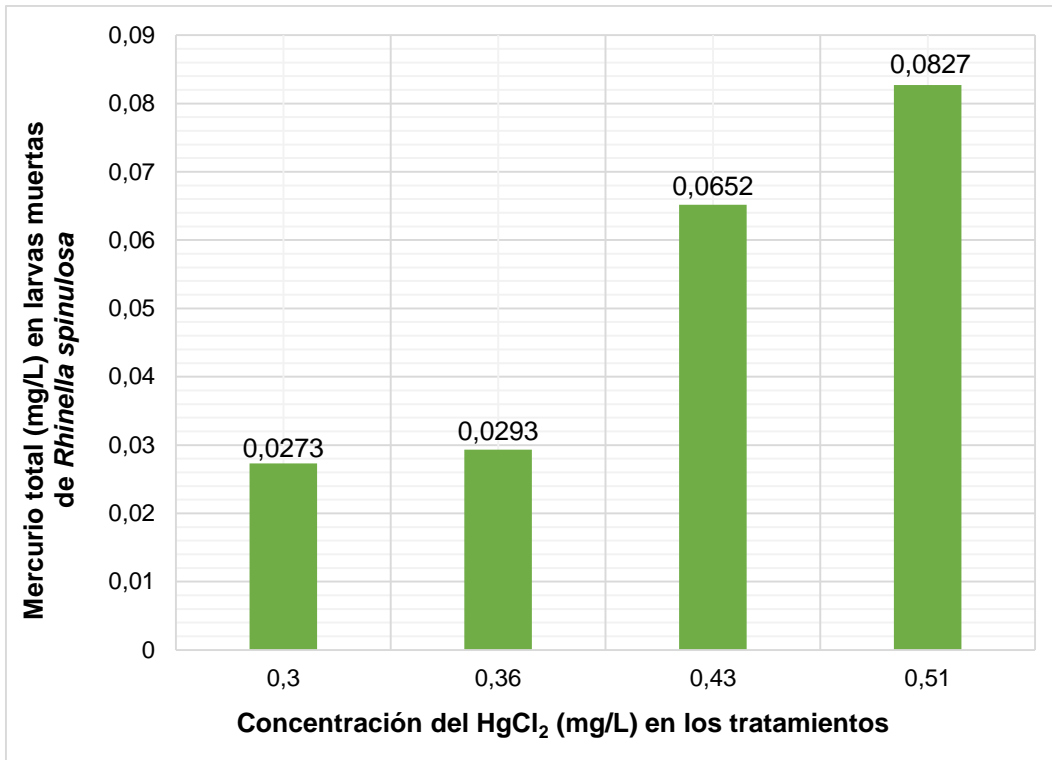


Figura 11. Mercurio total encontrado en larvas de *Rhinella spinulosa* expuestas a diferentes concentraciones de cloruro de mercurio (HgCl₂).

V. DISCUSION

En la tabla 4, se observa los valores promedios del porcentaje de mortalidad acumulada en larvas de *Rhinella spinulosa*, registrados a las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a 4 concentraciones crecientes de cloruro de mercurio (HgCl_2), resalta el hecho de que cuanto mayor es la concentración de dicha sustancia química, mayor es la mortalidad generada, tal es el caso que en la figura 2, se observa los porcentajes promedios de mortalidad de *Rhinella spinulosa* registrado en 24 horas para el cloruro de mercurio (HgCl_2), que a concentración de 0,51 mg/L de HgCl_2 la mortalidad es de 21%, a concentraciones menores existe cierta tolerancia, como por ejemplo a concentración de 0,43 mg/L de HgCl_2 la mortalidad es de 13%, a una concentración de 0,36 mg/L de HgCl_2 la mortalidad es de 1% y a una concentración de 0,30 mg/L de HgCl_2 la mortalidad es de 0%, lo que nos permite inferir que a concentraciones altas de HgCl_2 el producto es altamente toxico para las larvas de *Rhinella spinulosa*, expuestas a mayor tiempo. La figura 3 registra el porcentaje de mortalidad a 48 horas aun siendo concentraciones menores el efecto toxicológico es letal, se tiene que a una concentración de 0,30 mg/L de HgCl_2 la mortalidad es de 16%, a una concentración de 0,36 mg/L de HgCl_2 la mortalidad es de 24% y a una concentración de 0,43 mg/L de HgCl_2 la mortalidad es de 49% y a una concentración de 0,51 mg/L de HgCl_2 la mortalidad es de 76%. Los resultados mencionados se deben a que los organismos al ser expuestos a la sustancia toxica, son inmediatamente afectados a nivel de los neurotransmisores bloqueando la transmisión química de las neuronas lo que incrementa la mortalidad, al respecto se concuerda con lo mencionado por Escobar y Parra²⁸, donde señala que es importante considerar que con el incremento de las concentraciones de sustancias toxicas, en las poblaciones expuestas se generara mayor mortalidad, punto de vista que es compartida por Marrugo³¹, donde mencionan que los organismos determinan su tolerancia en

razón a la concentración, por lo que el nivel de riesgo aumenta y se produzcan daños asociados a la exposición de contaminantes presentes, pues se conoce que estos contaminantes son persistentes en el ambiente y a través de procesos biogeoquímicos pueden afectar a los organismos del medio en que se presentan. La figura 4, muestra los porcentajes promedios de mortalidad de *Rhinella spinulosa*, registrados a 72 horas a 4 concentraciones crecientes de cloruro de mercurio (HgCl_2), claramente se ve que a una concentración de 0,51 mg/L de HgCl_2 la mortalidad es letal al 100%, a una concentración de 0,30 mg/L de HgCl_2 la mortalidad es de 41%, a una concentración de 0,36 mg/L de HgCl_2 la mortalidad es de 55% y a una concentración de 0,51 mg/L de HgCl_2 la mortalidad es de 91%. Se observa que la mortalidad de las larvas se incrementa a medida que la concentración de dicha sustancia tóxica se incrementa idea que es compartida con Bulog⁵, menciona que los mayores porcentajes de mortalidad se da a mayores concentraciones y mayores tiempos de exposición y el porcentaje de mortalidad, sobre el tiempo de exposición guarda relación directa entre la mortalidad y la concentración, es así que el porcentaje de mortalidad es mayor a mayor tiempo de exposición, esta manifestación es sustentada por Castillo⁶, haciendo referencia a los bioindicadores que se encuentran en los sistemas acuáticos que están sometidos a sustancias toxicas, sean larvicidas o químicos agronómicos, que afectan de manera negativa en relación al grado de concentración y tiempo residual en el ambiente hídrico. Es por ello tener muy en cuenta al momento de trabajar con metales pesados ya que podrían generar desequilibrios metabólicos y posibles intoxicaciones o patologías menores que en exposiciones posteriores podría incrementar la sensibilidad y ocasionar la muerte. Por otro lado, la contaminación y la salud de los organismos en un estatus de riesgo deben de ser consideradas como parte de los programas de conservación de las especies.²⁰

La figura 5, muestra los porcentajes promedios de mortalidad de *Rhinella spinulosa*, registrados a 96 horas a 4 concentraciones crecientes de cloruro de mercurio (HgCl_2), a una concentración de 0,30 mg/L de HgCl_2 la mortalidad es del 73%, a una concentración de 0,36 mg/L de HgCl_2 la mortalidad es del 74%, y a una concentración de 0,43 mg/L de HgCl_2 la mortalidad es del 100% y a una concentración de 0,51 mg/L de HgCl_2 , la mortalidad ya no es registrada ya que el porcentaje de mortalidad fue del 100% solo a 72 horas de exposición.

Es de resaltar que las larvas de *Rhinella spinulosa* es una especie sensible al mercurio que demostraron efectos letales, de tal manera que el porcentaje de

mortalidad se incrementa a mayor tiempo de exposición, debido a que la mayor sensibilidad a mercurio se ha reportado en los primeros estados, como en la gástrula o por lo menos antes de la formación de las extremidades, afirmación que es compartida con Burger y Snodgrass⁹, al mencionar que los efectos letales del mercurio en los anuros en estado larval ocurre a través de la superficie del cuerpo por absorción directa desde el agua, consumo de sedimentos, absorción del aire durante la respiración y a través de la cadena alimenticia. Inicialmente las larvas entran en estrés, pero con cierta resistencia cambiando de color aparentemente de negro a un color plomizo con cierta inmovilidad, lo afirmado se comparte con Rowe⁸, que menciona, la pérdida de movilidad de las larvas está asociada con el incremento del costo metabólico debido a los procesos de depuración y detoxificación celular, a la reducción de la actividad de algunas enzimas y a la mayor demanda de síntesis de aminoácidos, tal es el caso que las larvas de *Rana catesbeiana* que habitan en aguas contaminadas con metales pesados experimentaron pérdida de peso, asociado a altos costos metabólicos. Con este concepto nos estaríamos aproximando a los resultados con la mortalidad del 50% de larvas que mueren a una determinada concentración y en un tiempo dado; del mismo modo, los resultados se comparten con los resultados obtenidos por Muñoz y Palacio⁴⁰, mencionan que las lavas de *Dendrosophus bogerti* es una especie sensible al mercurio, ya que demostraron inmovilidad temporal, tendencia a permanecer en el fondo del recipiente y contracciones musculares espasmódicas. La mortalidad de las larvas se incrementó con la concentración hasta alcanzar el 90% a 0,51 mg/L a las 96 h, por ello se afirma que las larvas de la *Rhinella spinulosa* resulta ser más sensible que las larvas de *Dendrosophus bogerti*, ya que a concentración de 0,51 mg/L de HgCl₂ a 72 horas de exposición ya se tiene el 100% de la mortalidad. El cloruro de mercurio (HgCl₂), es muy tóxico y peligroso por su gran solubilidad en agua (71,5 g/L a 25 °C), produciendo la muerte de peces en ríos o lagos ante un vertido, de cierta importancia que ocasionan alteraciones en los epitelios branquiales y dérmicos hasta ocasionar la muerte. En este caso, los peces actúan como sensores o indicadores de un problema toxicológico para los consumidores finales.²⁹

Los valores de la CL₅₀, para las larvas de *Rhinella spinulosa* (figura 7, 8, 9 y 10) muestra que a 96 horas fue de 0,254 mg/L de HgCl₂, a 72 horas fue de 0,324 mg/L de HgCl₂, a 48 horas fue de 0,4214 mg/L de HgCl₂ y a las 24 horas fue de 0,588 mg/L de HgCl₂, y los resultados obtenidos por Muñoz y Palacio⁴⁰, con un valor de

la CL₅₀ durante 96 horas fue 0,41 mg/L de HgCl₂, con estos resultados podemos inferir que son las concentraciones que causan el 50% de mortalidad de larvas de *Rhinella spinulosa*, que disminuyen cuanto mayor es el tiempo de exposición, y que las larvas *Rhinella spinulosa* resultan ser más sensibles que las lavas de *Dendrosophus bogerti* (0,41 mg/L), estas dos especies resultan ser más tolerantes al mercurio (Hg) que las larvas de la *Rana breviceps* (0,207 mg/L), *Rana pipens* (0,0073 mg/L) y *Bufo melanosticus* (0,056 mg/L)⁴¹, Frente a ello Escobar y Parra²⁸, mencionan que en lo que, verdaderamente nos conlleva a hacer aproximaciones de mortalidad, se presenta la tendencia de la concentración letal media (CL₅₀), en diferentes tiempo de exposición, observándose que cuanto menor es el tiempo de exposición de las sustancias toxicas mayor será la CL₅₀ que reporta, como también a mayor tiempo de exposición menor será la concentración letal media (CL₅₀), proporcionalmente menciona que es muy posible que una sustancia toxica pueda ser letal solo cuando las concentraciones es muy alta, produciéndose efectos malignos significativamente.

Durante la metamorfosis los anfibios son muy sensibles, información que es sustentada por Unrine¹⁰, donde menciona dicha sensibilidad a la exposición de sustancias químicas, es debido a que experimentan cambios comportamentales, morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. Aunque en todos los tratamientos con HgCl₂ se evidencio retraso en el movimiento de las larvas, en las mayores concentraciones, el efecto fue muy marcado y pudo estar relacionado con la interferencia de esta sustancia sobre la tiroides estrechamente relacionada con el proceso de la metamorfosis⁴, como se ha demostrado en peces²⁹, roedores³⁹ y humanos³⁰.

Las larvas de *Rhinella spinulosa*, además de ser de amplia distribución en el Valle de Huatatas, puede considerarse de mucha utilidad para evaluar la calidad del agua e integridad del ecosistema debido a la posición intermedia en las cadenas alimentarias debido a que se caracteriza por habitar áreas perturbadas, hecho que nos permite inferir su contacto con contaminantes en sus hábitats naturales. En la figura 11, se muestra la concentración de mercurio encontrado en las larvas muertas de *Rhinella spinulosa* sometidas a diferentes concentraciones, esto debido a que las branquias son el principal lugar de ingreso para las sustancias disueltas en el agua, lo que nos indica un nivel de concentración de mercurio relativamente alto con un rango de 0,0273 mg/L a 0,0827 mg/L de mercurio, lo encontrado se comparte con el trabajo realizado por Hernández⁴¹, donde reportan

las concentraciones de mercurio encontrados en las zonas de alto impacto que en promedio fueron de 0,1569 (\pm 0.007) $\mu\text{g/g}$ de mercurio para las siguientes especies: *Lithobates vaillanti*, *Rhinella margaritifera*, *Rhinella marina*, *Hypsiboas rosenbergi* y *Smillisca phaeota*, con una magnitud similar a la que se reporta en peces de Buenaventura sustentada por Rivera⁴², que reporta la cantidad de mercurio encontrado en un rango de 0,086 a 1,13 $\mu\text{g/g}$ lo que indica un nivel de contaminación relativamente alto, pues animales como la mojarra y la corvina deben presentar, de acuerdo a su alimentación, concentraciones muy por encima de consumidores de primer nivel como las especies de larvas de *Rhinella spinulosa* analizadas, de dieta generalmente sedimentívora; por medio de la cual pueden recoger cargas contaminantes y al servir de alimento a otros consumidores como peces, aves, mamíferos o reptiles, funcionan como vectores de dichas cargas al resto del ecosistema, dando origen así a procesos de biomagnificación que si pueden llegar a ser peligrosos, si se tiene en cuenta que los procesos se basan en la interacción organismo - ambiente.

VI. CONCLUSIONES

1. Los porcentajes de mortalidad causado por el cloruro de mercurio (HgCl_2) registrados para *Rhinella spinulosa* fue de 9% en promedio a concentraciones que oscilaron entre 0,30 mg/L y 0,51 mg/l a 24 horas de exposición, 41% en promedio a concentraciones que oscilaron entre 0,30 mg/L y 0,51 mg/l a 48 horas de exposición, 72% en promedio a concentraciones que oscilaron entre 0,30 mg/L y 0,51 mg/l a 72 horas de exposición y un 87% en promedio a concentraciones que oscilaron entre 0,30 mg/L y 0,51 mg/l a 96 horas de exposición, estos resultados demuestran que la exposición de las larvas a concentraciones superiores de 0,30 mg/l de HgCl_2 y mayores tiempos de exposición los porcentajes de mortalidad se incrementa.
2. La concentración letal media (CL_{50}) del cloruro de mercurio en larvas de *Rhinella spinulosa*, disminuyó a medida que el tiempo de exposición se prologó, oscilando entre 0,5880 mg/L y 0,2545 mg/L indicando que a esta concentración se espera que muera el 50% de larvas de *Rhinella spinulosa* expuestos al cloruro de mercurio.
3. Se cuantificó la concentración del mercurio en las larvas muertas de *Rhinella spinulosa* sometidas a cuatro concentraciones, donde muestran resultados muy marcadas que osciló entre 0,0273 mg/L y 0,0827 mg/L de mercurio.

VII. RECOMENDACIONES

1. Promover estudios en temas de investigación con bioensayos en metales pesados principalmente en mercurio, que es un elemento sumamente toxico para cualquier tipo de vida de los sistemas acuáticos, y así obtener registros de los cuerpos loticos y lenticos y sobre estos desarrollar planes de mejora o recuperación, lo que conllevara al desarrollo sostenible.
2. Es necesario utilizar un laboratorio de bioensayos exclusivamente para este tipo de pruebas. Si se trabaja con metales pesados o residuos peligrosos, es necesario contar con un lugar especial para preparar las soluciones y evitar la contaminación del laboratorio. Esto se debe a que existen residuos peligrosos que se disuelven en el agua y por lo tanto pueden ocasionar la muerte de los organismos de prueba.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Frost, D. Amphibian species of the world and the american museum of natural history.2009.
2. Marrugo J, Lans E. Impacto ambiental por contaminación con níquel, mercurio y cadmio en aguas, peces y sedimentos en la cuenca del río San Jorge, en el departamento de Córdoba. Montería (Córdoba): Centro de Investigaciones (CIUC), Universidad de Córdoba.2006.
3. Quirós Priego, J. "Prevención de riesgos laborales en la utilización de productos químicos. Etiquetado y Fichas Internacionales de Seguridad Química". 2003.
4. Albrecht J, Abalos M, Rice T. Heavy metal levels in ribbon snakes (*Thamnophis sauritus*) and anuran larvae from the Mobil Tensaw river Delta, Alabama, U. S. A. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2007; 53 (4): 647-654.
5. Bulog B, Mihajl K, Zvonka J, Mihael J. Trace element concentrations in the tissues of proteus anguinus (Amphibia, Caudata) and the surrounding environment. Water, Air, and Soil Pollution. 2002; 136 (14): 147-163.
6. Castillo G. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. México. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. 2004. 202.
7. Collins J, Storer A. Global amphibian declines: Sorting the hypotheses. Diversity and Distribution. 2003.
8. Rowe C, Kinney O, Fiori A, Congdon J. Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: Effects on grazing ability and growth. 1996.
9. Burger J, Snodgrass J. Metal levels in southern leopard frogs from the Savannah river site: location and body compartment effects. Environmental Research (Section A). 2001; 86 (2): 157-166
10. Unrine J, Hopkins W, Romanek C, Jackson B. Bioaccumulation of trace elements in omnivorous amphibian larvae: Implications for amphibian health and contaminant transport. Environmental Pollution. 2007; 149 (2): 182-192.
11. Environmental Protection Agency. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2ª ed. 2005.
12. Díaz P, Ortiz J. Evaluación del estado de conservación de los anfibios en Chile. 2003.
13. Angulo A, De La Riva, Córdoba J, Veloso A, Núñez H, Úbeda C et al. *Rhinella spinulosa*. IUCN. 2009
14. Palacio J, Muñoz E, Gallo S, Rivera M. Anfibios y reptiles del Valle de Aburrá. Medellín (Colombia): Editorial Zuluaga; 2006.
15. Taylor y Francis Group. Lethal and sublethal effects of mercury under controlled conditions. 2006.
16. Casarett D. Casarett and Doull's toxicology. Kansas city. Kansas. McGraw-Hill; 2001.
17. Del Valls T, Conradi M. Avances en ecotoxicología marina: comparación entre test de laboratorio y estudios in situ para la evaluación de la calidad ambiental de los sedimentos. Ciencias Marinas. 2000.
18. Hayes N, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A. Herbicides: Feminization of male frogs in the wild. Nature. 2002; 419: 895-896.
19. Rodríguez M, Franco M. Manual de toxicología básica. Ediciones Díaz de Santos; 2000.

20. Donat J, Dryden C. Transition metals and heavy metal speciation. Encyclopedia of ocean sciences, Steele J., Thorpe S. y Turekian K., Edition Academic Press. London; 2001.
21. Du Laing G, Bogaert F, Tachuela M, Verloo F, Hendrickx. Heavy metal contents (Hg, Cu, Zn) in spiders living in intertidal sediments of the river Scheldt estuary as affected by substrate characteristics. Science of the total environment. 2002; 289: 71-81.
22. Gutiérrez J, Salsamendi C. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Ediciones Díaz de Santos; 2001.
23. Napán K, Llanos C, Paredes C. Toxicidad aguda de metomilo en *Poecilia latipinna* (Lesueur, 1821) (Poeciliidae). Edición The Biologist. Lima. 2010; 8: 21-25.
24. Truhaut, R. "Ecotoxicology, Objectives, Principles and Perspectives", Ecotoxicology and Environmental Safety. 1977; 1: 151–173.
25. Repetto M. Toxicología Fundamental. Toxicología Experimental. Toxicidad Aguda. 3ª ed. España; 2002.
26. Sparling D, Krest S, Ortiz S. Effects of Lead Contaminated Sediment on *Rana sphenoccephala* tadpoles. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2006; 51 (3): 458-466
27. Sanz Sánchez, F. Sentido y Posibilidades de la Toxicología Ambiental. Discurso de Apertura del Curso Académico. 1974.
28. Escobar P, Parra R. Determinación de la concentración letal media CL₅₀ del arsénico y del níquel sobre *Daphnia pulex* [Tesis Grado]. [Bogotá, Colombia]. Universidad de la Salle; 2008.
29. Instituto de Manejo de Agua y Medio Ambiente. Efectos de la Contaminación por mercurio en la explotación aurífera aluvial en Madre de Dios. Madre de Dios. 1995.
30. Malm O, Pfeiffer W, Souza C, Reuther R. Mercury pollution due to gold mining in the Madeira River. Journal of the Human Environment. 1990; 19: 1-8.
31. Marrugo J, Benítez L, Olivero V. Distribution of mercury in several environmental compartments in an aquatic ecosystem impacted by gold mining in Northern Colombia. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2008; 55 (2): 305-316.
32. Arcos V, Castro R. Metales pesados en agua, sedimentos y organismos, proyecto BID-420 "Acumulación de pesticidas y metales pesados en los principales eslabones de la cadena trófica de la cuenca del Río Taura". Revista Científica Ciencias Naturales y ambientales. 2000. 103-120.
33. Ávila P, Zarazúa, G. Concentración de Metales Pesados en Ostiones (*Crassostrea virginica*), del Canal El Chijol, Veracruz México, Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 1993; 9: 53-64.
34. Álvarez F, Padilla F, Cuesta A, López A. Zoología aplicada. Ediciones Díaz de Santos. 2003; 493.
35. Hickman C, Roberts L, Keen S, Larson A, Anason H, Eisenhour D. Integrated Principles of Zoology. McGraw-Hill. 2008; 932.
36. IUCN. Red List of Threatened Species. Version 1. 2009.
37. Veloso A, Núñez H. Species Data Summaries. Chile Review Workshop. Universidad de Concepción. Global Amphibian Assessment. 2003.
38. Mella, J. Dinámica Poblacional de *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae) en el Monumento Natural El Morado, Región Metropolitana. Chile. 2006; 357:19-22.
39. Markey C. The development of Acute Toxicity in mouse study. Biol. Repro. 2001; 65:1215-1223.

40. Muñoz E, Palacio J. Efectos del cloruro de mercurio ($HgCl_2$) sobre la sobrevivencia y crecimiento de renacuajos de *dendrosophus bogerti*. [Tesis Grado]. [Bogotá, Colombia]. Universidad de Antioquia Medellín (Antioquia), 2010.
41. Hernández C, Fernando C, Páez M. Bioacumulación de mercurio en larvas de anuros en la zona afectada por la minería de oro en el río Dagua, Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia. 2013; 18(2): 341-348.
42. Rivera J. Peces de Buenaventura están contaminados con mercurio. Valle del Cauca; 2010; N° 138.

ANEXOS

ANEXO 1.

Número de larvas muertas de *Rhinella spinulosa* a diferentes concentraciones del Cloruro de mercurio de 24 a 96 horas de exposición.

		Concentración del HgCl ₂				
		0,30	0,36	0,43	0,51	Blanco
24 horas						
Nº de larvas	Recipiente 1	0	0	2	4	0
muertas de	Recipiente 2	0	0	4	5	0
<i>Rhinella</i>	Recipiente 3	0	0	2	4	0
<i>spinulosa</i>	Recipiente 4	0	1	2	4	0
48 horas						
Nº de larvas	Recipiente 1	3	5	10	15	0
muertas de	Recipiente 2	3	4	10	15	0
<i>Rhinella</i>	Recipiente 3	4	5	9	16	0
<i>spinulosa</i>	Recipiente 4	3	5	10	15	0
72 horas						
Nº de larvas	Recipiente 1	7	11	18	20	0
muertas de	Recipiente 2	8	10	18	20	0
<i>Rhinella</i>	Recipiente 3	9	12	18	20	0
<i>spinulosa</i>	Recipiente 4	9	11	19	20	0
96 horas						
Nº de larvas	Recipiente 1	14	17	20	20	0
muertas de	Recipiente 2	15	18	20	20	0
<i>Rhinella</i>	Recipiente 3	14	17	20	20	0
<i>spinulosa</i>	Recipiente 4	15	17	20	20	0

ANEXO 2.

Cantidad de Mercurio total encontrado en larvas de *Rhinella spinulosa* expuestos a diferentes concentraciones de cloruro de mercurio.

Concentración de HgCl ₂ (mg/L)	Mercurio total (mg/L) en larvas de <i>Rhinella</i> <i>spinulosa</i>
0,30	0,0273
0,36	0,0293
0,43	0,0652
0,51	0,0827
Control	0,0

ANEXO 3.

Percentiles (concentración letal en mg/L) del Cloruro de mercurio sobre larvas de *Rhinella spinulosa* (Amphibia: Anura) sometidas a las 24 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.

Porcentaje	Percentil	Error Estándar	Intervalo De Confianza Al	
			95%	
			Inferior	Superior
1	0,280846	0,0698898	-0,278925	0,362994
2	0,316845	0,0570778	-0,125647	0,386157
3	0,339685	0,0493241	-0,0292997	0,401756
4	0,356867	0,0437973	0,0423811	0,414288
5	0,370843	0,0395812	0,0998933	0,425276
6	0,382738	0,0362613	0,148003	0,435472
7	0,393169	0,0336155	0,189258	0,445338
8	0,402508	0,0315105	0,225157	0,455213
9	0,411001	0,0298591	0,256628	0,465371
10	0,418820	0,0285996	0,284271	0,476049
20	0,476916	0,0293406	0,421611	0,623456
30	0,518807	0,0392081	0,464601	0,785789
40	0,554602	0,0504355	0,491533	0,934298
50	0,588059	0,0619796	0,513926	1,07589
60	0,621515	0,0740552	0,535066	1,21873
70	0,657310	0,0873136	0,556931	1,37230
80	0,699201	0,103097	0,581950	1,55261
90	0,757298	0,125268	0,616060	1,80324
91	0,765116	0,128269	0,620616	1,83701
92	0,773609	0,131532	0,625557	1,87370
93	0,782949	0,135124	0,630983	1,91404
94	0,793379	0,139141	0,637033	1,95912
95	0,805275	0,143727	0,643922	2,01053
96	0,819251	0,149122	0,652003	2,07095
97	0,836432	0,155763	0,661920	2,14525
98	0,859272	0,164604	0,675076	2,24404
99	0,895271	0,178564	0,695761	2,39979

ANEXO 4.

Percentiles (concentración letal en mg/L) del Cloruro de mercurio sobre larvas de *Rhinella spinulosa* (Amphibia: Anura) sometida a las 48 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.

Porcentaje	Percentil	Error estándar	Intervalo de confianza al 95	
			Inferior	Superior
1	0,142193	0,0661264	-0,101029	0,231592
2	0,174936	0,0585091	-0,0391272	0,254459
3	0,195710	0,0537289	0,0000408	0,269073
4	0,211338	0,0501685	0,0294328	0,280140
5	0,224050	0,0473002	0,0532838	0,289199
6	0,234870	0,0448824	0,0735362	0,296959
7	0,244357	0,0427834	0,0912501	0,303805
8	0,252851	0,0409232	0,107071	0,309976
9	0,260576	0,0392493	0,121421	0,315625
10	0,267687	0,0377257	0,134595	0,320862
20	0,320529	0,0271905	0,230772	0,361488
30	0,358631	0,0212457	0,296276	0,394628
40	0,391189	0,0184816	0,346227	0,428965
50	0,421619	0,0187732	0,384781	0,469193
60	0,452049	0,0217478	0,415809	0,516946
70	0,484606	0,0268954	0,443954	0,573089
80	0,522709	0,0342904	0,473693	0,641995
90	0,575550	0,0456936	0,512437	0,740053
91	0,582661	0,0472852	0,517531	0,753369
92	0,590387	0,0490249	0,523044	0,767857
93	0,598881	0,0509494	0,529081	0,783811
94	0,608368	0,0531113	0,535798	0,801655
95	0,619188	0,0555915	0,543429	0,822035
96	0,631900	0,0585224	0,552360	0,846014
97	0,647527	0,0621471	0,563296	0,875537
98	0,668302	0,0669962	0,577772	0,914844
99	0,701044	0,0746944	0,600475	0,976909

ANEXO 5.

Percentiles (concentración letal en mg/L) del Cloruro de mercurio sobre larvas de *Rhinella spinulosa* (Amphibia: Anura) sometida a las 72 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.

Porcentaje	Percentil	Error estándar	Intervalo de confianza al 95	
			Inferior	Superior
1	0,148545	0,0524169	-0,0472341	0,218928
2	0,169195	0,0475098	-0,0076085	0,233223
3	0,182297	0,0444187	0,0174879	0,242337
4	0,192154	0,0421074	0,0363383	0,249222
5	0,200171	0,0402380	0,0516501	0,254844
6	0,206995	0,0386554	0,0646654	0,259647
7	0,212978	0,0372751	0,0760623	0,263873
8	0,218335	0,0360457	0,0862534	0,267670
9	0,223208	0,0349335	0,0955097	0,271136
10	0,227693	0,0339152	0,104019	0,274337
20	0,261019	0,0265715	0,166781	0,298594
30	0,285050	0,0216731	0,211181	0,316941
40	0,305583	0,0179874	0,247983	0,333754
50	0,324775	0,0152763	0,280588	0,351262
60	0,343968	0,0137137	0,310125	0,371837
70	0,364501	0,0137586	0,336802	0,398775
80	0,388532	0,0159996	0,361788	0,436536
90	0,421858	0,0215622	0,390089	0,495254
91	0,426343	0,0224361	0,393603	0,503451
92	0,431216	0,0234078	0,397370	0,512406
93	0,436573	0,0245000	0,401459	0,522305
94	0,442556	0,0257453	0,405970	0,533416
95	0,449380	0,0271938	0,411055	0,546150
96	0,457397	0,0289283	0,416958	0,561181
97	0,467254	0,0311007	0,424130	0,579744
98	0,480356	0,0340431	0,433550	0,604535
99	0,501006	0,0387751	0,448201	0,643804

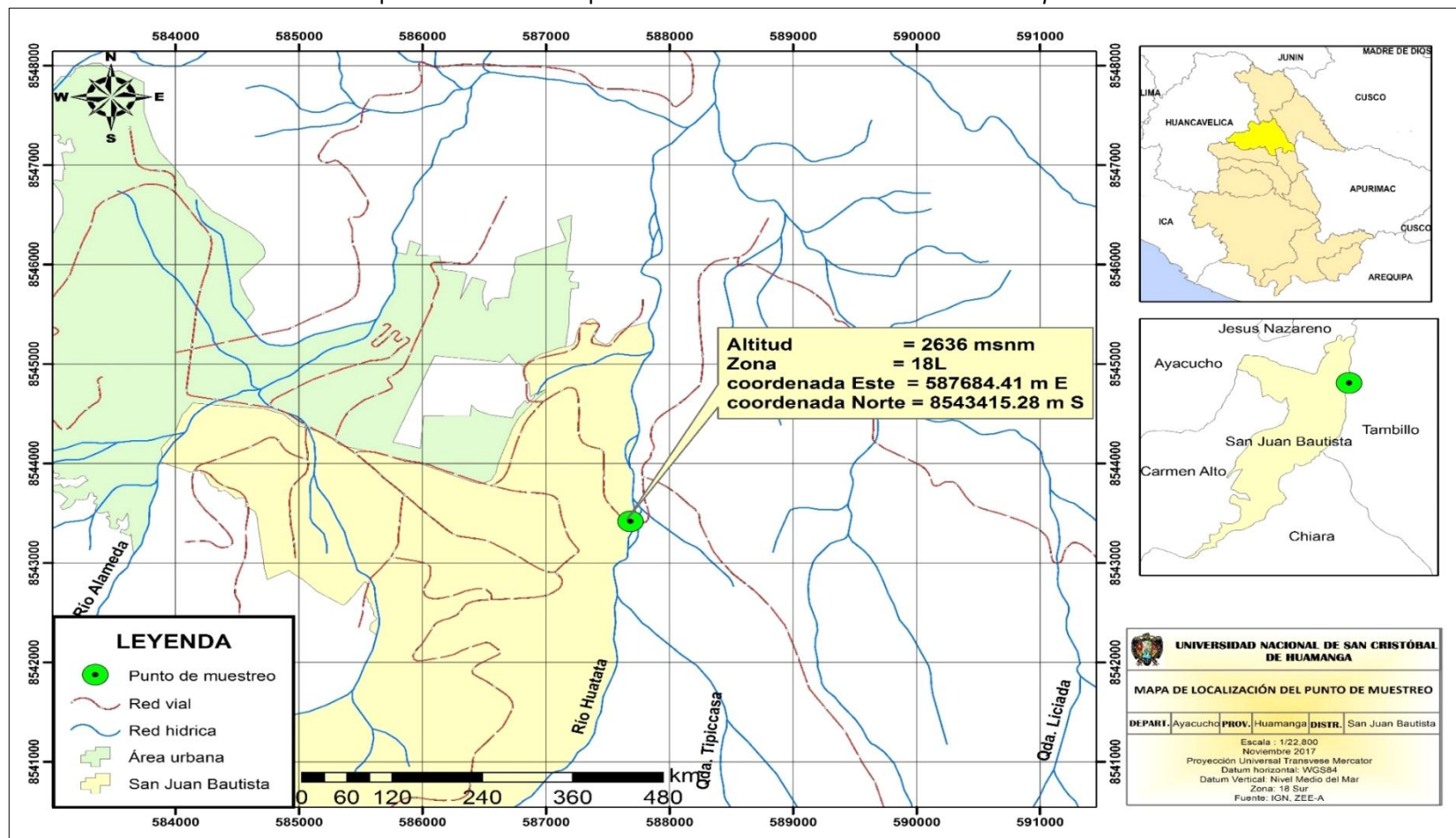
ANEXO 6.

Percentiles (concentración letal en mg/L) del Cloruro de mercurio sobre larvas de *Rhinella spinulosa* (Amphibia: Anura) sometida a las 96 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.

Porcentaje	Percentil	Error estándar	Intervalo de confianza al 95	
			Inferior	Superior
1	0,0844847	0,107573	-1,33231	0,199533
2	0,104411	0,0990233	-1,19717	0,210527
3	0,117054	0,0936102	-1,11146	0,217526
4	0,126565	0,0895453	-1,04699	0,222806
5	0,134301	0,0862438	-0,994561	0,227111
6	0,140885	0,0834379	-0,949944	0,230783
7	0,146659	0,0809810	-0,910831	0,234010
8	0,151828	0,0787842	-0,875816	0,236906
9	0,156530	0,0767888	-0,843977	0,239545
10	0,160858	0,0749545	-0,814674	0,241979
20	0,193016	0,0614166	-0,597121	0,260259
30	0,216204	0,0518049	-0,440572	0,273762
40	0,236018	0,0437629	-0,307187	0,285680
50	0,254537	0,0364861	-0,183081	0,297386
60	0,273056	0,0296165	-0,0600332	0,310149
70	0,292870	0,0231323	0,0688964	0,326522
80	0,316058	0,0179886	0,207447	0,358024
90	0,348216	0,0191631	0,311645	0,489658
91	0,352544	0,0200746	0,317680	0,515360
92	0,357245	0,0212104	0,323345	0,544174
93	0,362415	0,0226076	0,328806	0,576623
94	0,368188	0,0243195	0,334233	0,613536
95	0,374773	0,0264286	0,339819	0,656239
96	0,382509	0,0290721	0,345818	0,706974
97	0,392020	0,0325057	0,352634	0,769904
98	0,404662	0,0372921	0,361084	0,854170
99	0,424589	0,0451678	0,373568	0,987818

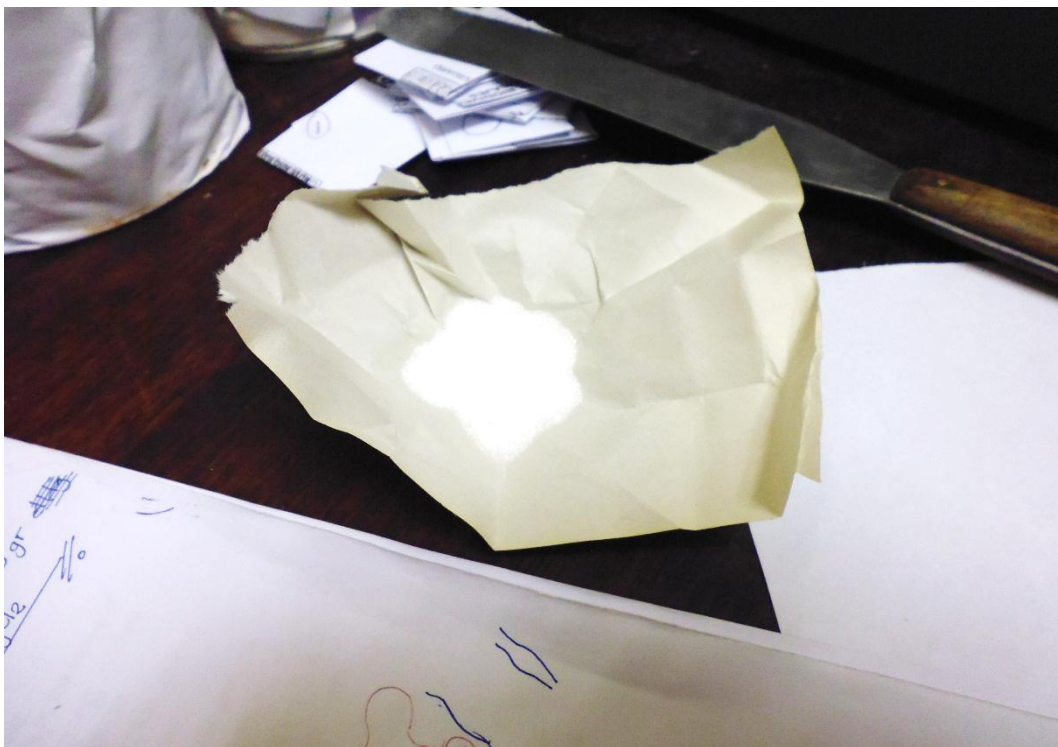
ANEXO 7.

Mapa de ubicación del punto de colecta de las larvas de *Rhinella spinulosa*.



ANEXO 8.

Sal de cloruro de mercurio (HgCl_2).



ANEXO 9.

Placas petri conteniendo larvas muertas de *Rhinella spinulosa* en la estufa para el secado correspondiente.



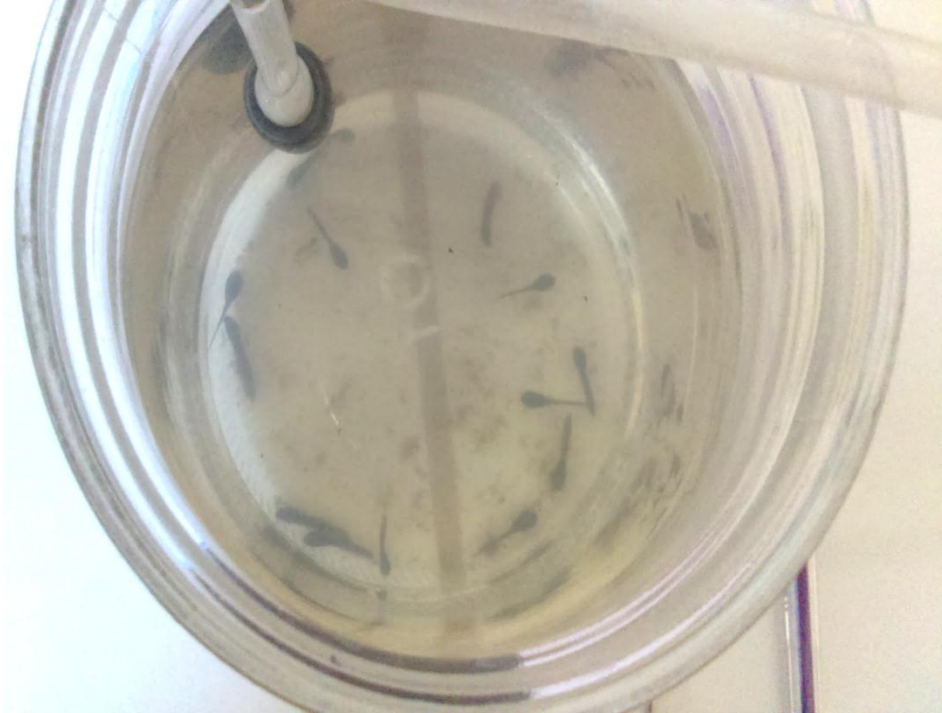
ANEXO 10.

Batería utilizada para el experimento.



ANEXO 11.

Vista de larvas muertas después de haber sido expuestas al cloruro de mercurio (HgCl_2).



ANEXO 12.

Placas Petri conteniendo larvas muertas de *Rhinella spinulosa* expuestas a una concentración de 0.51 mg/l de cloruro de mercurio (HgCl_2).



ANEXO 13.

Placas Petri conteniendo larvas muertas de *Rhinella spinulosa* expuestas a una concentración de 0.43 mg/l de cloruro de mercurio (HgCl₂).



ANEXO 14.

Informe emitido por el laboratorio ENVIROLAB de los resultados de análisis de mercurio.

	NSF Envirolab LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACION INACAL-DA CON REGISTRO N° LE-011
INFORME FINAL	
Dirección de Entrega: Karina Conga Karina Conga Pachin A.H. Covadonga Mz. D Lt. 20 Ayacucho Peru	Solicitante: C0311373 Karina Conga Pachin A.H. Covadonga Mz. D Lt. 20 AYA Peru
Resultado Completo	Fecha de Informe 2016-09-26
Procedencia Laboratorio Facultad de Ciencias Biológicas - UNSCH Producto Agua Tipo de Servicio Análisis Informe de Ensayo N° J-00229320 Coordinador de Proyecto Melissa Janeth Simon Fowks	
Gracias por utilizar los servicios de NSF Envirolab. Por favor, póngase en contacto con el Coordinador de Proyecto, si desea información adicional o cualquier aclaración que pertenecen a este informe.	
Informe Autorizado por  	Fecha de Emisión 2016-09-26
Enrique Quevedo Bacigalupo Jefe de Laboratorio	Quim. Joel Atarama Orejuela Supervisor de Fisicoquímica C.Q.P. N° 923
Av. La Marina 3059 San Miguel - Lima 32 PERU Tel: (511) 616-5400 Fax: (511) 616-5418 Email: envirolab@nsf.org Web: www.envirolabperu.com.pe F120160926130202 J-00229320 pág 1 de 4	
El presente informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente excepto con la aprobación por escrito de NSF Envirolab. Solamente los documentos originales son válidos y NSF Envirolab no se responsabiliza por la validez de las copias. Estos resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas del producto ni la autorización de uso de la Marca NSF. Los resultados se refieren únicamente a los elementos analizados, en la condición de muestra recibida por el laboratorio.	

ANEXO 15.

Informe emitido por el laboratorio ENVIROLAB de los resultados de análisis de mercurio.



Información General

Matriz: Agua
 Solicitud de Análisis: Cotización N° 31341 (Set-474)
 Muestreado por: Cliente
 Procedencia: Laboratorio Facultad de Ciencias Biológicas - UNSCH

Identificación de Laboratorio: S-0001295870
 Tipo de Muestra: Agua de Proceso
 Identificación de Muestra: 0.30
 Fecha de Recepción/Inicio de Análisis: 2016-09-15
 Fecha y hora de Muestreo: 2016-09-14 17:30

Análisis	Fecha de Fin de Análisis	Resultado	Unidad
Química			
* Mercurio Total en Agua. EPA Method 245.7(Validado), Revised 2 Febrero 200	2016-09-22		
Mercurio Total		0,027 3	mg/L

Identificación de Laboratorio: S-0001295871
 Tipo de Muestra: Agua de Proceso
 Identificación de Muestra: 0.36
 Fecha de Recepción/Inicio de Análisis: 2016-09-15
 Fecha y hora de Muestreo: 2016-09-14 17:30

Análisis	Fecha de Fin de Análisis	Resultado	Unidad
Química			
* Mercurio Total en Agua. EPA Method 245.7(Validado), Revised 2 Febrero 200	2016-09-22		
Mercurio Total		0,029 3	mg/L

Identificación de Laboratorio: S-0001295872
 Tipo de Muestra: Agua de Proceso
 Identificación de Muestra: 0.43
 Fecha de Recepción/Inicio de Análisis: 2016-09-15
 Fecha y hora de Muestreo: 2016-09-14 17:30

Análisis	Fecha de Fin de Análisis	Resultado	Unidad
Química			
* Mercurio Total en Agua. EPA Method 245.7(Validado), Revised 2 Febrero 200	2016-09-22		
Mercurio Total		0,065 2	mg/L

Identificación de Laboratorio: S-0001295873
 Tipo de Muestra: Agua de Proceso
 Identificación de Muestra: 0.51
 Fecha de Recepción/Inicio de Análisis: 2016-09-15
 Fecha y hora de Muestreo: 2016-09-14 17:30

Análisis	Fecha de Fin de Análisis	Resultado	Unidad
----------	--------------------------	-----------	--------

FI20160926130202

J-00229320

pág 2 de 4

El presente informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente excepto con la aprobación por escrito de NSF Envirolab. Solamente los documentos originales son válidos y NSF Envirolab no se responsabiliza por la validez de las copias. Estos resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas del producto ni la autorización de uso de la Marca NSF. Los resultados se refieren únicamente a los elementos analizados, en la condición de muestra recibida por el laboratorio.

ANEXO 16.

Informe emitido por el laboratorio ENVIROLAB de los resultados de análisis de mercurio.



Análisis	Fecha de Fin de Análisis	Resultado	Unidad
Química (Continúa...)			
* Mercurio Total en Agua. EPA Method 245.7(Validado), Revised 2 Febrero 200	2016-09-22		
Mercurio Total		0.082 7	mg/L



FI20160926130202

J-00229320

pág 3 de 4

El presente informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente excepto con la aprobación por escrito de NSF Envirolab. Solamente los documentos originales son válidos y NSF Envirolab no se responsabiliza por la validez de las copias. Estos resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas del producto ni la autorización de uso de la Marca NSF. Los resultados se refieren únicamente a los elementos analizados, en la condición de muestra recibida por el laboratorio.

ANEXO 17.
Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEORICO	HIPOTESIS	VARIABLES	METODOLOGIA
¿Cuál será el efecto toxicológico agudo en larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> sometido a diferentes concentraciones de cloruro de mercurio en condiciones de laboratorio?	<p>GENERAL Evaluar el efecto toxicológico agudo del cloruro de mercurio en larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> bajo condiciones de laboratorio.</p> <p>ESPECIFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar el porcentaje de mortalidad en larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> en cuatro concentraciones de cloruro de mercurio, en un periodo de 24, 48, 72 y 96 horas. • Calcular la concentración letal media (CL₅₀) de cloruro de mercurio en larvas de <i>Rhinella spinulosa</i>, en 24, 48, 72 y 96 horas. • Determinar la concentración de mercurio en las larvas muertas de <i>Rhinella spinulosa</i>, sometidas a cuatro concentraciones de cloruro de mercurio. 	<p>ANTECEDENTES MARCO CONCEPTUAL MEDIOAMBIENTE El medio ambiente se define como el entorno vital, el conjunto de factores físicos, biológicos, culturales, económicos estéticos que interactúan entre sí, con el individuo y con la comunidad con la que vive, determinando su forma, carácter, relación y supervivencia.</p> <p>ECOSISTEMA EL AGUA Importancia del agua Contaminación del agua <i>Rhinella spinulosa</i> Taxonomía, Descripción</p> <p>METALES PESADOS EL MERCURIO Ciclo de mercurio Usos del mercurio Fuentes de mercurio El mercurio en el medio ambiente acuático</p> <p>MARCO LEGAL Estándares de calidad ambiental del agua (D.S 004-2017 MINAM) Límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades minero-metalúrgicos.</p>	La toxicidad aguda del cloruro de mercurio probado en cuatro concentraciones crecientes sobre larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> se incrementa en relación directa al preparado.	<p>DEPENDIENTE • Tasa de mortalidad de <i>Rhinella spinulosa</i>.</p> <p>Indicadores: • Numero de larvas muertas a 24, 48, 72 y 96 horas.</p> <p>INDEPENDIENTE • Concentración de HgCl₂.</p> <p>Indicador: 4 concentraciones de HgCl₂ y 1 concentración 0 de HgCl₂</p> <p>Unidades Experimentales: Larvas de <i>Rhinella spinulosa</i>, en recipientes de vidrio de 1L de capacidad.</p>	<p>TIPO DE INVESTIGACION Básica – experimental</p> <p>POBLACION 400 larvas de <i>Rhinella spinulosa</i>, sometidos a diferentes concentraciones de cloruro de mercurio.</p> <p>MUESTRA 20 larvas de <i>Rhinella spinulosa</i>, por recipiente con cuatro repeticiones más un control cada uno.</p> <p>METODO Colecta de las larvas de <i>Rhinella spinulosa</i></p> <p>ANALISIS DE DATOS - Determinación del porcentaje de mortalidad - Determinación de mercurio en las larvas de <i>Rhinella spinulosa</i> por espectrofotometría de absorción atómica.</p>