



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EFFECTOS LETALES Y SUBLETALES EN LOS MACROINVERTEBRADOS
ACUÁTICOS DE LAS AGUAS CONTAMINADAS POR MERCURIO

AUTOR

Sebastián Hervás Velasco

AÑO

2020



FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS APLICADAS

EFFECTOS LETALES Y SUBLETALES EN LOS MACROINVERTEBRADOS
ACUÁTICOS DE LAS AGUAS CONTAMINADAS POR MERCURIO

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera Ambiental en Prevención y
Remediación

Profesor guía

Dr. Christian Patricio Villamarín Flores

Autor

Sebastián Hervás Velasco

Año

2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Efectos Letales y Subletales en los Macroinvertebrados Acuáticos de las Aguas contaminadas por mercurio, a través de reuniones periódicas con el estudiante Sebastián Hervas Velasco, en el semestre 2020-20, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



Christian Patricio Villamarín Flores

Doctor en Ecología Fundamental y Aplicada

C.I. 1002339404

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Efectos Letales y Subletales en los Macroinvertebrados Acuáticos de las Aguas contaminadas por mercurio, Sebastián Hervas Velasco, en el semestre 2020-20, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



Blanca Patricia Ríos Touma

Doctora en Estudios Avanzados en Ecología

C.I.1707113765

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”



Sebastián Hervas Velasco

C.I. 1717765042

DEDICATORIA

A Gloria y Francisco.

RESUMEN

La actividad minera es un sector productivo en auge dentro del país. En sus procesos se utilizan una amplia gama de metales pesados, entre ellos el mercurio. Elemento que, gracias a la generación de descargas hacia cuerpos de agua dulce, tiene un carácter tóxico que conlleva al detrimento de los ecosistemas acuáticos y los servicios que proveen a poblaciones humanas. En el presente trabajo de titulación se llevó a cabo un estudio donde se realizaron ensayos de exposición de mercurio con diferentes concentraciones a individuos del género *Nectopsyche*, que reúnen una serie de características apropiadas para llevar a cabo el estudio en microcosmos de laboratorio. Se trabajó con tres concentraciones de mercurio en base a bibliografía y la legislación: 0.0001 mg/L, 0.0002 mg/L y 0.002 mg/L. La experimentación tuvo un tiempo de 7 días. Se realizó la medición de parámetros fisicoquímicos cada 24 horas, donde se denotó una tendencia ascendente en el pH y descendente en el oxígeno disuelto. La mortalidad tiene una relación directamente proporcional a la concentración de mercurio utilizada y al tiempo de experimentación, caso contrario en la movilidad donde se observó una reducción de actividad en concentraciones más elevadas y a medida que transcurrían los días. Los individuos muertos a lo largo del experimento fueron preservados para analizar su bioacumulación. Se determinó una relación directa entre la concentración de mercurio en su medio y la de los organismos. A su vez la concentración de 0.002 mg/L presenta una mayor variabilidad debido a la superación del umbral de tolerancia (mayor mortalidad). Se estableció que su factor de bioacumulación (BAF) es cercano a 1, lo que indica que los individuos presentan una concentración de mercurio igual a la encontrada en su medio, catalogándose así como excelentes bioindicadores de este contaminante.

ABSTRACT

Mining is a thriving productive sector within the country. A wide range of heavy metals, including mercury, are used in its processes. Mercury, thanks to the generation of discharges to freshwater bodies, has a toxic nature that leads to the detriment of aquatic ecosystems and the services they provide to human populations. In this study, an experimentation process was developed where mercury exposure tests with different concentrations were carried out on individuals of the *Nectopsyche* genus in a microcosm facility. These insects, meet a series of characteristics appropriate to carry out the laboratory study. Three mercury concentrations, based on scientific literature and legislation, were used: 0.0001 mg/L, 0.0002 mg/L and 0.002 mg/L. The experimentation lasted 7 days. Physicochemical parameters were measured every 24 hours, where an upward trend in pH and a decreasing trend in dissolved oxygen were denoted. Mortality has a directly proportional relationship to the concentration of mercury used and the time of experimentation. On the other hand, mobility measurements presented a reduction in activity at higher concentrations and as the days passed. Deceased individuals throughout the experiment were preserved to analyze their bioaccumulation. A direct relationship between the concentration of mercury on the environment and their organisms was determined. Eventually the concentration with 0.002 mg/L shows greater variability due to exceeding the tolerance threshold (increased mortality). It was established that their bioaccumulation factor (BAF) is close to 1, which indicates that individuals have a mercury concentration equal to that found in their environment, thus being classified as excellent bioindicators of this pollutant.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Problemática	4
1.3 Objetivos	5
1.3.1 Objetivo General	5
1.3.2 Objetivos Específicos.....	5
1.4 Justificación.....	6
1.5 Alcance	7
2. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1 Ecotoxicología en Ecosistemas Acuáticos.....	8
2.2 Biomonitorio Ambiental.....	8
2.3 Biomagnificación y su relación con los efectos subletales	10
2.4 Biodisponibilidad de contaminantes.....	11
2.6 Análisis Estadístico En Estudios Biológicos.....	12
3. METODOLOGÍA.....	13
3.1 Recolección de individuos	13
3.2 Concentraciones de mercurio	13
3.3 Microcosmos	14
3.4 Diseño experimental.....	15
3.5 Mediciones fisicoquímicas en el laboratorio durante el experimento	15

3.6 Mediciones de mortalidad, movilidad y bioacumulación...	16
3.6.1 Tasa de mortalidad	16
3.6.2 Tasa de movilidad.....	16
3.7 Biodisponibilidad del mercurio en el agua y bioacumulación	16
3.8 Análisis de Datos.....	17
4. RESULTADOS	17
4.1 Parámetros fisicoquímicos.....	17
4.1.1 pH.....	18
4.1.2 Temperatura.....	19
4.1.3 Conductividad	20
4.1.4 Oxígeno Disuelto.....	21
4.2 Mortalidad	21
4.3 Movilidad	23
4.4 Bioacumulación	25
4.4.1 Concentración de Mercurio	26
4.4.2 Factor de Bioacumulación (BAF).....	28
5. DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	32
6.1 Conclusiones.....	32
6.2 Recomendaciones.....	33
REFERENCIAS.....	35
ANEXOS	46

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La minería es una de las actividades productivas más importantes del Ecuador, para 2021 se espera que esta componga el 4% del Producto Interno Bruto (PIB) del país y que el aporte económico combinado entre 2017 al 2021 sea de aproximadamente 10000 millones de dólares (Illescas, 2018). La minería está dividida por 3 tipos de actividades siendo estas: minería a gran escala, mediana y pequeña escala, y minería artesanal (Narváez, 2012). La última, en su mayor parte, se encuentra compuesta por minería ilegal. Debido a sus bajos parámetros de control esta es la causante de los mayores impactos al ambiente por tonelada extraída (Emmanuel, 2013).

Como menciona Sandoval (2011), la minería ilegal surge en los años 70, donde actividades informales toman el proyecto minero abandonado por la Compañía Industrial Minera Asociada (CIMA) en la zona de Portovelo, cantón Zaruma y posteriormente en los años 80 se desarrollan actividades informales en Nambija y Ponce Enríquez. Estos contaban con escaso desarrollo técnico-científico en su producción y solo se encontraban normados por cooperativas que tenían limitada regulación del Estado Ecuatoriano. La técnica más comúnmente utilizada en este tipo de explotaciones consiste en la recuperación de los minerales a través de métodos de concentración gravimétrica, posteriormente se realiza una amalgamación manual con mercurio al aire libre mediante el proceso de destilación por calor. En los años 90 se empiezan a evidenciar conflictos socioambientales de mayor escala debido a la quema de mercurio, contaminación de cuerpos de agua, acumulaciones de residuos sólidos, afectaciones al suelo y pasivos ambientales acumulados. (Sandoval, 2011).

En un estudio realizado por Oviedo-Anchundia, et al (2017) se evidencia la presencia de mercurio y otros metales pesados en suelos, agua y en habitantes de poblaciones de la provincia de El Oro tales como Balsas, Marcabelí y Las Cajas.

Esto debido a su ubicación en la cuenca media y baja del río Pindo-Puyango. En Portovelo y Zaruma se realizaron pruebas de intoxicación a 200 personas en total, los resultados arrojaron que 52% y 57% respectivamente de los individuos presentan intoxicación por mercurio. En los mismos cantones se encontró valores máximos de mercurio en orina de 97 $\mu\text{g/L}$, metil mercurio en pelo de 6,09 $\mu\text{g/g}$, y mercurio en sangre de 32,49 $\mu\text{g/L}$ siendo estos valores superiores a los valores de referencia aceptables según el Instituto Nacional de Medicina y Seguridad del Trabajo de la unión europea (Instituto Nacional de Medicina y Seguridad del Trabajo, 1999). En los relaves de amalgamación y las colas de cianuración ubicadas en Portovelo y Zaruma se han registrado altas concentraciones de metales pesados. Es así que los ríos adyacentes presentan una mayor contaminación y a su vez mayor posibilidad del ingreso de estos en forma de sólidos suspendidos a organismos vivos en verano que en invierno.

Los impactos del mercurio a nivel ecotoxicológico y de consumo humano están reconocidos desde los años 50. La concentración máxima admisible (CMA) para mercurio en agua potable estipulada por la Environmental Protection Agency de Estados Unidos (USEPA, 1972) es de 0.002 mg/L. Este parámetro es comparable a la normativa nacional en la Tabla 1 del Anexo 1 del Libro IV del Texto Unificado Legislación Secundaria, Medio Ambiente (TULSMA, 2015): Criterios de calidad de fuentes de agua para consumo humano y doméstico, antes de implementarse tratamiento convencional, detallando un parámetro más permisivo de 0.006 mg/L. A nivel ecosistémico se tiene como referencia la Tabla 3 del TULSMA (2015): Criterios de Calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario que muestra una concentración máxima de 0.0002 mg/L. Concentraciones del metal por encima de estos parámetros conllevan graves consecuencias para conservación de ecosistemas acuáticos.

Las principales fuentes directas de mercurio son mayormente antropogénicas e incluyen la minería y quema de combustibles fósiles (Streets, 2017), aunque en la cuenca amazónica se ha determinado que la deforestación es el principal contribuyente a la liberación de mercurio en el sistema (Siqueria et al., 2018). Lo

mismo ocurre con las fuentes indirectas donde por actos antropogénicos se altera las características biogeoquímicas de los ecosistemas y ocurren procesos como metilación de mercurio, aumento de su biodisponibilidad e incremento de la exposición de organismos al mismo (Chan, 2003).

La deforestación es un factor potenciador de los impactos del mercurio dentro de ecosistemas acuáticos. La erosión de partículas finas es la causante de la transferencia de mercurio terrestre hacia cuerpos de agua. Es ahí donde se produce un aumento de la biodisponibilidad de metil-mercurio para organismos filtrantes como algunos macroinvertebrados es generalmente mayor que la de mercurio inorgánico (Roulet et al., 2000). La adsorción de metil-mercurio que puede estar unido a sedimentos por parte de organismos acuáticos es rápida y eficiente, incluso en la ingesta de partículas inorgánicas con bajo valor nutricional (Gagnon & Fisher, 1997).

La biodisponibilidad del mercurio en ecosistemas acuáticos y sus efectos sobre mamíferos provocado por la ingestión de peces comúnmente presentes en su dieta ha sido estudiada a profundidad por Scheuhammer et al. (1988, 1998, 1999). En tejido de mamíferos, a una concentración de 0.1 mg/Kg ocurren principalmente efectos en la reproductividad de los organismos estudiados, como una menor producción de células reproductivas y una menor tasa de reproducción satisfactoria. A 0.5 mg/Kg se presentan efectos conductuales tales como menor función vital, menor movimiento y capacidad migratoria, y respuestas inadecuadas a estímulos. A una concentración de 5 mg/Kg se denotan efectos neurotóxicos los cuales incluyen lesiones cerebrales, degradación de médula ósea, disfunción del sistema nervioso central, descoordinación muscular y reducción del apetito.

La minería tiene un impacto integral dentro de ecosistemas acuáticos. El mercurio tiene la capacidad de biodisponibilizarse a través de todos los elementos de este tipo de ecosistemas incluyendo suelo, sedimento, agua, y biota conjuntamente con toda la red trófica. En el estudio de Eisler (1987) se informa presencia de toxicidad

por mercurio orgánico en el rango de 0.00004 a 0.00088 mg/L y de mercurio inorgánico de 0.0001 a 0,044 mg/L en agua. Por ende, se ha demostrado que el mercurio es una potente neurotoxina para la mayoría de los vertebrados, por la carencia de barreras externas o sistemas de desintoxicación internos. La problemática radica en que, aunque se ha demostrado que el elemento en dosis grandes es letal para peces, estos tienen tolerancia a la exposición de dosis pequeñas donde se almacenan en el tejido muscular esquelético y posteriormente se bioacumulan en mamíferos y humanos (Zillioux et al., 1993).

1.2 Problemática

Los macroinvertebrados acuáticos tienen la capacidad de asimilar el mercurio encontrado en cuerpos de agua (Molina et al., 2010). Estas comunidades de organismos acuáticos están compuestas de una gran cantidad de especies con hábitos de alimentación muy diferentes, hábitats complejos y roles ecológicos diversos (Wallace et al., 1996). Este grupo en particular requiere investigaciones detalladas para evaluar su papel en la acumulación de mercurio y su subsecuente traspaso a los peces y ser humano (Žižek et al., 2007). Su tasa de bioacumulación tiene una alta variabilidad y una gran parte de esta podría atribuirse a diferencias en la química del agua particular de cada río y sedimentos, nichos ecológicos en que habitan y ciclos de vida específicos de especies (Allen et al., 2005). El mercurio tiene la capacidad de biomagnificarse al tener en libre movimiento entre los sistemas de cadena tróficas. Por ejemplo, se puede trasladar del sistema acuático al terrestre. Tal como menciona Rimmer et al. (2009) las concentraciones de mercurio aumentan colectivamente de organismos autótrofos a herbívoros < detritívoros < omnívoros < carnívoros. La absorción de mercurio se produce principalmente a partir de ingestión. Como resultado, la concentración en los animales está controlada en gran medida por la concentración en sus presas y, en última instancia, por el grado de biomagnificación en las cadenas alimentarias (Bisi et al., 2012). Los invertebrados litorales sirven como una fuente importante de alimento para los peces en la mayoría de los lagos. Estos pueden desempeñar un papel cuantitativamente importante en la removilización del mercurio sedimentario y en la regulación de los flujos de mercurio biodisponible en los cuerpos de agua. En

ecosistemas acuáticos, la entrada total de mercurio generalmente está determinada por la carga manejada por la cuenca hidrográfica y la cantidad y frecuencia de mercurio utilizado en actividades antrópicas dentro de la misma (Hurley et al., 1995). Una parte esencial del proceso es la materia húmica que transporta el elemento y domina los flujos orgánicos en los lagos. La materia húmica particulada y disuelta se puede utilizar mediante alimentación por filtración o por invertebrados acuáticos que basan su alimentación en depósitos, ya sea directamente o por medio de microorganismos. Estas cadenas tróficas pueden ser cruciales para la disponibilidad y enriquecimiento de mercurio y su consecuente bioacumulación y biomagnificación (Parkman, 1993). El estudio de la bioacumulación y efectos del mercurio en macroinvertebrados es de vital importancia para la región, ya que los éstos son de los grupos más usados en la bioevaluación de ríos (Prat et al., 2009) y además son esenciales para la elaboración en estudios de línea base y monitoreo de actividades mineras (Ministerio del ambiente, 2016)

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Identificar los efectos letales y subletales en los macroinvertebrados acuáticos de las aguas contaminadas por mercurio.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Establecer el efecto de distintas concentraciones de mercurio en la tasa de mortalidad de *Nectopsyche* (Letpoceridae: Trichoptera)
- Analizar los efectos subletales presentes en *Nectopsyche* (Letpoceridae: Trichoptera) afectados por aguas con mercurio.
- Identificar la relación entre la concentración del mercurio en el agua y su biodisponibilidad para afectar a *Nectopsyche*.

1.4 Justificación

La minería en Ecuador es una actividad de alto impacto negativo para los ecosistemas, en especial los de tipo acuático ya que en estos es donde el elemento tiene un alto grado de biodisponibilidad. Los procesos de obtención de minerales requieren altas cantidades de agua, como menciona Gunson (2012) los valores se encuentran alrededor de $0.76\text{m}^3/\text{t}$ de mineral, donde en algunos proyectos se la reinyecta al sistema y en otros se la vierte continuamente. El mercurio se encuentra en varias formas en el ambiente, puede actuar como elemento inocuo o de fácil asimilación dependiendo de las características del medio donde se encuentre, al igual que la forma molecular en la que este se encuentre (Kotnik et al., 2007). Las vías de contaminación por mercurio más comunes para humanos son a través de la inhalación de sus gases tóxicos, y el proceso de bioacumulación y biomagnificación del elemento a través de la cadena trófica (Silva-Forsberg et al. 1999). En este último, el frecuente consumo de productos pesqueros y mariscos es la principal causa de afectaciones letales y subletales en humanos (OMS, 2017).

El mercurio tiene la capacidad de producir efectos tóxicos letales y subletales en peces, pájaros y mamíferos dependiendo de su concentración (Calabrese et al, 1977). El elemento tiene la capacidad de transferirse a través de la cadena trófica debido a su adhesión de largo plazo a los tejidos del organismo hospedero y receptor. Por ende, el estudio de macroinvertebrados es esencial ya que su exposición al contaminante es perjudicial a todo el ecosistema gracias a su abundancia, y diversidad de hábitats que ocupan. Estos cumplen un rol importante en la transferencia trófica de mercurio a peces, vida silvestre y humanos. (Alonso y Campos, 1999). Muchos macroinvertebrados tienen estadios larvarios en los cuales son consumidos por peces y aves acuáticas, a su vez en etapas adultas donde emergen del agua y pueden ser consumidos por insectívoros terrestres. Consecuentemente efectos subletales del mercurio sobre macroinvertebrados causan anomalías en su comportamiento que afectan directa e indirectamente su rol dentro del ecosistema causando así desbalances ecológicos en distintos niveles tróficos (Henderson, 2012).

En la industria minera el mercurio es utilizado para formar una amalgama donde el 80% de este se libera a la atmósfera y el 20% permanece en suelos, sedimentos, agua y biota. La interacción del metal pesado con los ecosistemas genera cambios en la composición física, química y biológica de los mismos (Siqueira et al., 2018). En el país especialmente esto genera un alto índice de riesgo ya que la biodiversidad de los ecosistemas se vería alterada por la toxicidad que conllevaría la presencia de mercurio. A su vez, el agua provee servicios ecosistémicos esenciales para las poblaciones para actividades agrícolas y ganaderas. Encontrándose estas como las actividades con mayor uso de agua en el país (Ludeña et al., 2012).

Nectopsyche pertenece al grupo Trichoptera, que es orden de macroinvertebrados con alta sensibilidad a cambios ambientales (Holzenthall et al., 2015). La familia a la que pertenece, Leptoceridae, consta como una de las más sensibles a la contaminación orgánica en el Índice Biótico Andino, ABI (Ríos-Touma et al., 2014). Su abundante presencia en la cuenca alta del Alambí, cercano al laboratorio de la UDLA, en donde se harán los experimentos, constituye una ventaja para su uso. Por estas razones es un taxón ideal para usarlo en la determinación de los efectos letales y subletales.

1.5 Alcance

El presente trabajo de titulación aspira examinar los efectos letales y subletales en los macroinvertebrados acuáticos del género *Nectopsyche* colectados en una subcuenca del Río Guayllabamba que corresponde al río Alambí. Con los individuos extraídos se realizará un ensayo de toxicidad con mercurio en laboratorio con microcosmos. Los parámetros a medir incluirán tasa de mortalidad, movilidad y biodisponibilidad. Los tratamientos en el experimento se diferenciarán en sus concentraciones de mercurio, que estarán acorde a bibliografía especializada en contaminación de agua por minería, la legislación y un control.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Ecotoxicología en Ecosistemas Acuáticos

La ecotoxicología tiene como principal objetivo el estudio de efectos adversos y el impacto de sustancias químicas invasivas sobre la biodiversidad, estructura y funciones de un ecosistema (Walker et al., 2012). Su importancia radica en estrategias para identificar, predecir, controlar y mitigar los impactos negativos de actividades antropogénicas hacia el medio ambiente y sus componentes (Wiener et al., 2003). A nivel molecular nos ayuda a comprender los efectos específicos de estas sustancias sobre individuos, de esta manera podemos predecir efectos poblacionales que se traducen a un detrimento y anomalías de su ecosistema. Los efectos incluyen a una disminución de la actividad biológica de los individuos en sus sistemas funcionales debido a las condiciones de estrés a las que estos están sometidos. Esta exposición ambiental no se encuentra solamente determinada por la cantidad del xenobiótico presente, depende también de la interacción de esta sustancia con el medio a manera de poder transformarse en especies con un mayor índice de toxicidad (Lynch et al., 1998).

Los ecosistemas acuáticos, debido a su fácil acceso, alto dinamismo y fragilidad, se encuentran claramente expuestos a sustancias químicas tóxicas capaces de alterar su ecosistema (Malins, 2018). Aquí los organismos acuáticos toman un rol esencial como herramienta para establecer parámetros de permisibilidad para descargas de efluentes de carácter tóxico hacia su medio. Los estudios ecotoxicológicos son la base para la definición de parámetros de biomonitoreo a través de la representación del ciclo de un xenobiótico en el medio modelando el proceso de exposición, acumulación, metabolismo, excreción y permanencia de un xenobiótico en un organismo acuático (Pritchard, 1993).

2.2 Biomonitoreo Ambiental

El biomonitoreo ambiental es una herramienta esencial para la conservación del medio ambiente y la protección de la salud humana. Es una metodología

extensamente utilizada para evidenciar el nivel de contaminación dentro de un área específica a través del tiempo. El proceso consiste en el muestreo y análisis de un componente biológico para evaluar la calidad de su medio, el cual puede ser agua, suelo o biota (Artiola y Brusseau, 2019). La metodología involucra la recolección de una o más muestras a través de procesos estandarizados y replicables a futuro. Se debe tomar en cuenta un plan de muestreo, procedimiento de recolección, transporte y conservación de muestras, y métodos de análisis. Se debe tener un extenso conocimiento sobre los procesos físicos, químicos y biológicos que se llevan a cabo dentro del área a ser monitoreada para enlazarlos con los resultados del análisis de los organismos clave del monitoreo (Artiola y Warrick, 2004). Los datos provenientes del biomonitoreo ambiental son claves para la creación de planes de evaluación de riesgos y consecuentemente ser aplicados para el desarrollo de normas ambientales (Springer, 2010). Este tipo de estudios expresan el impacto de alteraciones antropogénicas a ecosistemas donde, a través de una buena interpretación de datos, se puede valorar la extensión de los efectos de dicha actividad, la respuesta del ecosistema sobre dicho impacto y las medidas de prevención, mitigación o restauración a tomarse (Bohan et al., 2017).

Dentro de esta herramienta existen las llamadas “especies indicadoras” que se encuentran caracterizadas como especies que tienen necesidades específicas con respecto a variables físicas, químicas y biológicas (Prat et al., 2009). En presencia de anomalías de estas variables fuera de su rango normal, tienden a mostrar cambios sobre las poblaciones o individuos. Los efectos individuales comúnmente son de tipo fisiológico, morfológico, reproductivos y vitales. Mientras que los poblacionales alteran su interacción, competencia y distribución (Bedregal et al., 2009). Estas especies se encuentran definidas como un reflejo a las afectaciones a su medio. Aunque las respuestas al estrés ambiental se originan en los niveles bioquímicos y fisiológicos de los organismos, la metodología más utilizada evalúa la abundancia de estos a distintos niveles de exposición al contaminante en un periodo de tiempo determinado (Johnson et al., 1993).

Los macroinvertebrados acuáticos tienen características que las convierten en organismos clave para el biomonitoreo ambiental. Están definidos como organismos comúnmente encontrados en todo tipo de ecosistemas acuáticos con la capacidad de tolerar y acumular cantidades significativas de contaminantes (Goodyear y McNeill, 1999). Algunos, de carácter sedentario, se encuentran fuertemente asociados a su hábitat por ende son una gran herramienta para analizar las características de calidad ambiental de zonas específicas. Estos, al encontrarse cerca de la base de la cadena trófica, constituyen un factor crítico en la transferencia de contaminantes a través de la cadena trófica. Por otra parte, las larvas de macroinvertebrados son encontrados en abundancia y son fáciles de recolectar, siendo así ideales para estudios de biomonitoreo continuo (Nahmani y Rossi, 2003).

2.3 Biomagnificación y su relación con los efectos subletales

La biomagnificación se encuentra definida como la transferencia de un elemento químico del alimento de un individuo a su organismo, lo que resulta en una mayor concentración en el organismo que en su dieta o en el medio donde se desarrolla (Marcovecchio et al., 1986). El resultado de la continuidad de este proceso es la acumulación de tal elemento químico a medida que sube dentro de una cadena trófica específica (Ibelings et al., 2005). Los metales pesados son característicos por su capacidad de bioacumulación y biomagnificación. Los organismos acuáticos son los más susceptibles a estos fenómenos ya que absorben contaminantes del medio circundante a una tasa más alta de la que pueden excretarlos (Soto-Jiménez, 2011). Estos tienen afectaciones holísticas dentro de la cadena trófica. Ingresan en organismos de niveles tróficos bajos donde, gracias a su baja concentración, se comportan como sustancias inocuas (Suede et al., 1994). A medida que van subiendo a través de la cadena trófica estos se presentan en concentraciones más altas en los organismos donde son causantes de efectos subletales (Alonso y Campos, 1999). Esta subletalidad se presenta como el mayor riesgo para organismos en niveles tróficos altos ya que, por sus hábitos dietarios, la sustancia se biomagnifica e incrementa su concentración y toxicidad hasta llegar a niveles donde se presentan efectos subletales críticos o su vez la muerte del individuo. (Tomaila y Iannacone, 2018).

El estudio de metales pesados en ecosistemas acuáticos es una herramienta esencial para realizar un análisis de riesgos en una etapa temprana para controlar los efectos de la bioacumulación (Croteau et al., 2005). Los metales pesados tienen propiedades acumulativas, son de naturaleza no-biodegradable y tienen una larga vida media, por ende este mecanismo de control es óptimo, ya que de esta manera se busca solucionar la causa en la fuente (Molina et al., 2011). Estudios realizados por Moalla et al (1997) y Braccia y Voshell (2006) muestran una fuerte correlación entre la presencia de metales pesados en el agua y en organismos dentro del ecosistema provocado por efluentes provenientes de desechos industriales peligrosos. La exposición a estos contaminantes puede determinar efectos de carácter letal tales como un incremento en la tasa de mortalidad, o decrecimiento de la tasa de supervivencia en comunidades más sensibles o efectos subletales como cambios en actividad reproductiva, tasa de crecimiento y anomalías en la tasa de movilidad (Kouba et al., 2010).

2.4 Biodisponibilidad de contaminantes

En la evaluación de riesgos ecotoxicológicos es fundamental tener en cuenta los procesos de biodisponibilidad de los contaminantes, su relación con los cálculos de consumo y ecuaciones de exposición (Simpson et al., 2016). Esta valoración es de tipo compleja ya que envuelve un vasto número de factores y procesos fisicoquímicos que serán útiles para predecir el impacto de contaminantes en el ecosistema. Los dos mecanismos principales de transferencia de contaminantes hacia los organismos son: el contacto directo con su medio y la ingesta dietaria (Van Straalen et al., 2005). La influencia de procesos de partición, conversión y transformación de compuestos químicos sobre el ecosistema es sumamente alta, por ende es esencial su análisis (Anderson y Hillwalker, 2008)

La determinación de metales pesados tóxicos en sedimentos, agua y biota puede ser un buen método para abordar la evaluación de la biodisponibilidad de metales y los efectos biológicos y ecológicos resultantes de esa exposición. La biodisponibilidad está determinada por las propiedades del medio, en el caso de ecosistemas acuáticos estos se componen de: características conductuales y

fisiológicas de los organismos bentónicos, propiedades sedimentarias, y propiedades de aguas confinadas en acuíferos porosos y suprayacentes (Roman et al., 2007). Un amplio rango de factores físicos, químicos y biológicos inciden también en la biodisponibilidad de metales. Estos incluyen: temperatura, especiación, solubilización, porcentaje de materia orgánica, cantidad de carbono orgánico total, interacciones tróficas, y textura del lecho (McAloon y Mason, 2003). Una característica de los elementos a tomar en cuenta es su lipofilia, esta se encuentra determinada por el coeficiente de partición octanol-agua y es un determinante fuerte del riesgo de biomagnificación (Ibelings et al., 2005).

La biodisponibilidad guarda una relación directa con el pH del medio, en este caso el agua. Mientras que en el mar ocurren cambios en este parámetro de tipo regional con fluctuaciones irregulares, en agua dulce estas fluctúan con regularidad. Esto debido a que estos ecosistemas contienen altas concentraciones de ácido húmico que tiene un rol de buffer en el pH y bajas concentraciones de bases en exceso (Wright, 1995). Al momento que un contaminante ingresa al sistema altera las condiciones de normalidad y ocurre un efecto ecotoxicológico en cadena donde los cambios en el pH biodisponibilizan al contaminante y se facilita la transferencia de este a la biota (Thompson, 2018).

2.6 Análisis Estadístico En Estudios Biológicos

El análisis estadístico de un estudio experimental relacionado al área de la biología y afines se desarrolla acorde a protocolos estadísticos establecidos que puede ir variando conforme las necesidades del estudio o según los datos que se vayan presentando en el tiempo (Depoy y Gitlin, 1994). Comúnmente existen tres etapas dentro de este procedimiento. La primera es la preparación de datos donde se descartan datos irrelevantes, imprecisos o que generen ruido. La segunda es el análisis estadístico descriptivo en el cual se representan las principales características y medidas de resultado de la base de datos, esto incluye medidas de distribución, tendencia y dispersión (Chan, 2003). La tercera es una prueba de

hipótesis a través de la correcta selección y aplicación de una prueba estadística correcta, donde en estudios de este tipo se utiliza un margen de error del 5% (Dinu et al., 2019).

La bioestadística es la aplicación de herramientas y modelos matemáticos utilizados en estadística al campo de las ciencias naturales y biológicas (Brody, 2012). Entre las principales aplicaciones se encuentran medidas estadísticas para resumir métodos experimentales y datos para desarrollar una inferencia en parámetros poblacionales con el objetivo de crear estrategias y tomar decisiones sobre una población cuando sólo una muestra es observada (Page et al., 1995). Específicamente se utiliza estimación y pruebas de hipótesis para tests paramétricos y no paramétricos, los resultados se presentan en ejemplos ilustrativos de fácil comprensión y aplicación para establecer y comprobar el conocimiento biológico (Gerhardt et al., 1994)

3. METODOLOGÍA

3.1 Recolección de individuos

El sitio de muestreo de los individuos de *Nectopsyche* (Letpoceridae, Trichoptera) se encuentra en el Río Alambí, subcuenca del río Guayllabamba. La cual se la realizó con una red D, se buscó zonas de acumulación de hojarasca, donde se realizó patadas que nos permitan obtener los individuos. Posteriormente la muestra fue dispuesta en una bandeja blanca y manualmente con ayuda de pinzas entomológicas se retiró los individuos de *Nectopsyche*. (Higuera y Gómez, 2018). Este procedimiento se repitió las veces necesarias hasta conseguir el número de individuos requeridos. Se recolectaron 150 individuos para la experimentación, de los cuales 100 fueron utilizados dentro de la experimentación.

3.2 Concentraciones de mercurio

En las unidades experimentales se utilizó tres concentraciones diferentes de

mercurio, estas siendo 0.0001 mg/L, 0.0002 mg/L y 0.002 mg/L y un testigo. Se tomó la concentración de 0.0002 mg/L basándose en los parámetros de la Tabla 3: Criterios de Calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario del Anexo 1 del Libro IV del Texto Unificado Legislación Secundaria, Medio Ambiente (TULSMA, 2015). La concentración de 0,0001 mg/L se tomó de la referencia de parámetros tomados de minería artesanal (Appleton, 2001). La concentración de 0,002 mg/L se tomó de la referencia del parámetro de nivel máximo de contaminante establecido por el Safe Drinking Water Act (EPA, 1991). Para cada una de las unidades experimentales se utilizaron 2 réplicas. El número de individuos por unidad experimental es de 12. La experimentación se realizó en un periodo de 7 días.

3.3 Microcosmos

Se usaron 8 microcosmos de vidrio que equivalen al número de unidades experimentales, estos consisten en peceras circulares con sistemas de aireación. Se utilizaron bombas de aire JAD SC-7500 para el abastecimiento de oxígeno. Para el experimento, se empleó agua de la llave de clorada, para esto se reposó el agua por un tiempo de 24 horas con el fin de generar inocuidad al desarrollo de los macroinvertebrados. Durante 7 días se los mantuvo en el Laboratorio de Investigación del Campus Queri, en un cuarto climatizado en condiciones de luz artificial con periodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y una temperatura climatizada de 18°C.

Se elaboró el alimento en base a la dieta común de los macroinvertebrados encontrados en el sitio de recolección. Para esto se recolectó rocas ubicadas en el punto de muestreo. Se procedió a realizar la extracción del perifiton encontrado en las rocas, esto a través de un raspado superficial. Este material fue colocado en una bandeja donde estos microorganismos lo colonizaron. El periodo de colonización fue de 2 semanas y las condiciones de temperatura y iluminación serán las mismas que con los microcosmos.

3.4 Diseño experimental

El diseño experimental cuenta con réplicas al azar. Este se encuentra definido por la siguiente estructura a continuación:

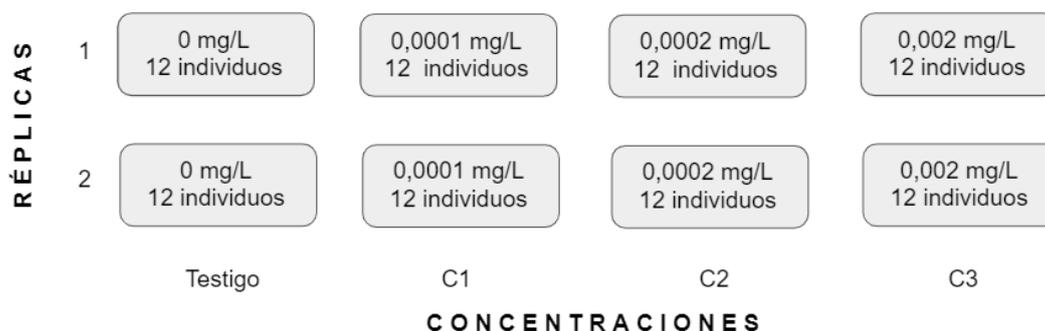


Figura 1. Diseño Experimental

Se tomaron cuatro concentraciones: Blanco, C1 (0.0001 mg/L), C2 (0.0002 mg/L), C3 (0.002 mg/L) y se realizó dos réplicas por concentración. Cada unidad experimental contó con 12 individuos. El mercurio fue añadido después de un periodo de 3 días de acondicionamiento para los individuos.

3.5 Mediciones fisicoquímicas en el laboratorio durante el experimento

Se realizó un monitoreo de 4 variables fisicoquímicas en el agua de cada unidad experimental, estas siendo: oxígeno, conductividad, pH y temperatura. Las mediciones fueron realizadas con los equipos YSI Pro 1030 y YSI Pro Odo (Yellow Spring Instruments). El monitoreo fue llevado a cabo una vez al día a una hora establecida por todo el tiempo de desarrollo del experimento. Esto con el fin de reconocer los efectos del metal pesado mercurio sobre el medio y tener la capacidad de controlar estas respuestas abruptas para tener resultados fehacientes. (Martínez-Jerónimo y Espinosa, 2008). Los datos fueron tomados diariamente entre las 10:00 y 12:00 horas. La medición se la realizó introduciendo las sondas en los microcosmos y el dato fue tomado el momento en que el medidor se estabilizó.

3.6 Mediciones de mortalidad, movilidad y bioacumulación

3.6.1 Tasa de mortalidad

Se registró el número de individuos sobrevivientes cada 24 horas desde la hora de inicio de la experimentación. En el periodo establecido se realizó el conteo continuo de macroinvertebrados vivos y muertos. Consecuentemente, se procesaron los datos para obtener un gráfico de dispersión y tendencia de mortalidad a lo largo del tiempo de experimentación (Postma, 1994). Posterior al registro diario, los individuos muertos fueron sustraídos y conservados a -20°C para su posterior análisis de bioacumulación.

3.6.2 Tasa de movilidad

Se valoró la movilidad de los macroinvertebrados en forma de ciclos de brazadas. Se establecieron 3 parámetros de movilidad: alta, moderada, baja. Los parámetros respondan a mediciones de movilidad tomadas al inicio de la experimentación donde se midió el número de ciclo de brazadas de los individuos y se establecieron rangos aplicables a los 3 parámetros. En la movilidad alta se encuentran los individuos con un índice mayor a 60 brazadas por minuto, en la movilidad moderada los que están en el rango de 60 a 30 brazadas por minuto y en la movilidad baja los individuos con un índice menor a 30 brazadas por minuto.

3.7 Biodisponibilidad del mercurio en el agua y bioacumulación

Al concluir la fase de experimentación en microcosmos, se colocaron a los macroinvertebrados en un tubo cónico Eppendorf, se los conservó a -20°C . Este proceso asegura la conservación de concentraciones de mercurio en tejidos para el consecuente análisis. Se utilizó la cantidad aproximada de 0,1 mg de macroinvertebrados por muestra. Las muestras fueron colocadas a digestión con ácido nítrico para su preparación. En la determinación este parámetro se utilizó el método de espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Se estimó que los resultados de esta medición tendrán un error de aproximadamente $\pm 5\%$. Posteriormente se calculó el factor de bioacumulación (BAF) que equivale a la concentración de THg en los individuos sobre la

concentración de THg en su medio circundante en este caso la concentración de Hg en el agua, este factor pudiendo ser aplicado también a todos los niveles de la cadena trófica del individuo (Becker, 1995).

3.8 Análisis de Datos

Una vez finalizada la etapa de experimentación se recopiló, categorizó y analizó los datos. Se debe tomar en cuenta que el experimento realizado solamente cuenta con dos réplicas, por ende el análisis debe ser tomado con cautela. Los principales conjuntos de datos obtenidos se dividen en las cuatro categorías anteriormente mencionadas: parámetros fisicoquímicos, mortalidad, movilidad y bioacumulación. Se realizó un análisis estadístico comprobando la normalidad de los datos a través de la prueba de Shapiro-Wilik, este paso es esencial en estudios toxicológicos ya que los fenómenos biológicos siguen la distribución normal (Shapiro y Wilik, 1965). En el análisis se incluyó también los descriptores media, mínimos, máximos, desviación estándar y varianza. Los datos fueron analizados a través de dos variables: tiempo en días y las concentraciones descritas en el diseño experimental: Blanco, C1 (0.0001 mg/L), C2 (0.0002 mg/L), C3 (0.002 mg/L). Las diferencias significativas fueron establecidas a través de un análisis de varianza ANOVA y el análisis de datos fue realizado por un análisis Post-Hoc de Tukey test. El análisis estadístico se lo realizó en el software libre JASP 0.12.2.0.

4. RESULTADOS

4.1 Parámetros fisicoquímicos

La valoración fisicoquímica no presentó mucha variación a lo largo del experimento y los tratamientos. La desviación estándar para los parámetros de pH, temperatura y O₂ disuelto es baja indicando la baja dispersión entre datos, caso contrario en la conductividad (Tabla 1, Figura 2).

Tabla 1. Análisis Estadístico de parámetros fisicoquímicos.

	pH	Temperatura	Conductividad	O ₂ Disuelto
Promedio	7.769	14.575	191.950	2.897
P-value Shapiro-Wilk	0.314	0.448	0.079	0.054
Mínimo	7.300	13.800	169.000	1.240
Máximo	8.450	15.600	221.000	5.400

4.1.1 pH

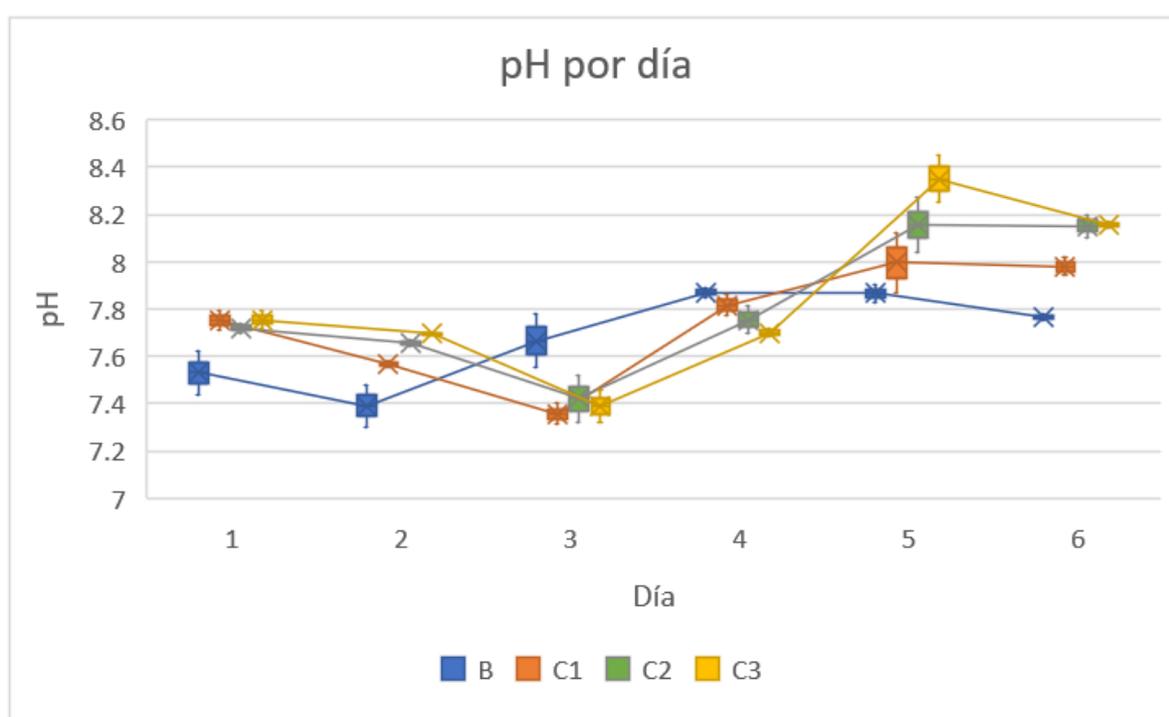


Figura 2. pH tomado durante el tiempo de experimentación.

Los valores de pH oscilaron entre 7.3 y 8.45 (Tabla 1). Los valores del ANOVA de 2 vías (tratamientos*días) mostraron diferencias significativas ($F=4.88$; $p=0.001$) que se acentuaron principalmente al final del experimento (Fig 2). El pH mostró una tendencia descendente desde el primer al tercer día y ascendente del tercer al último día de la experimentación en cada uno de los tratamientos, a excepción del Blanco que los valores se mantuvieron relativamente estables (Fig 2) esto pudo ser comprobado a través del análisis Post-Hoc del ANOVA (Anexo 2).

4.1.2 Temperatura

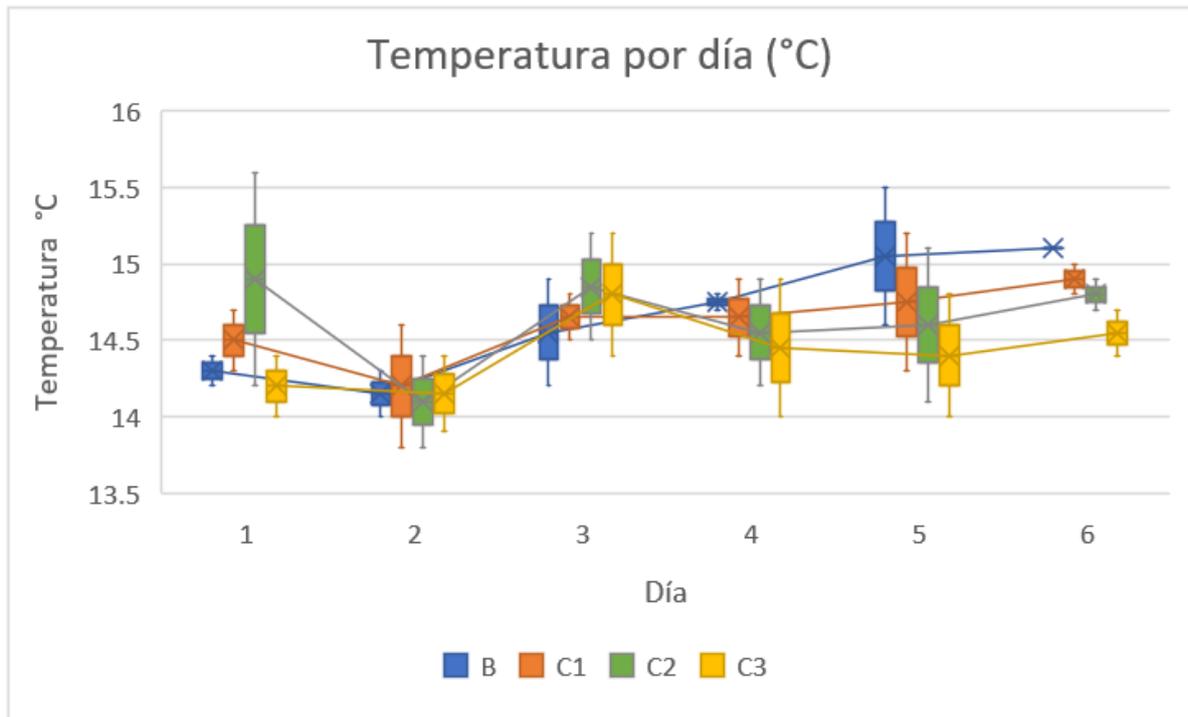


Figura 3. Temperatura tomada durante el tiempo de experimentación. En el diagrama la "x" representa la media, la caja el rango intercuartil y los bigotes el mínimo y máximo.

La temperatura varió entre 13.8 y 15.6 (Tabla 1). En los valores del ANOVA no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el tiempo de experimentación ($F=2.084$; $p=0.103$), ni tampoco entre tratamientos ($F= 0.562$; $p=0.646$). Los valores no tienen un patrón de tendencia visible y existe una alta variación entre valores tomados en un mismo tratamiento y día (Fig 3).

4.1.3 Conductividad

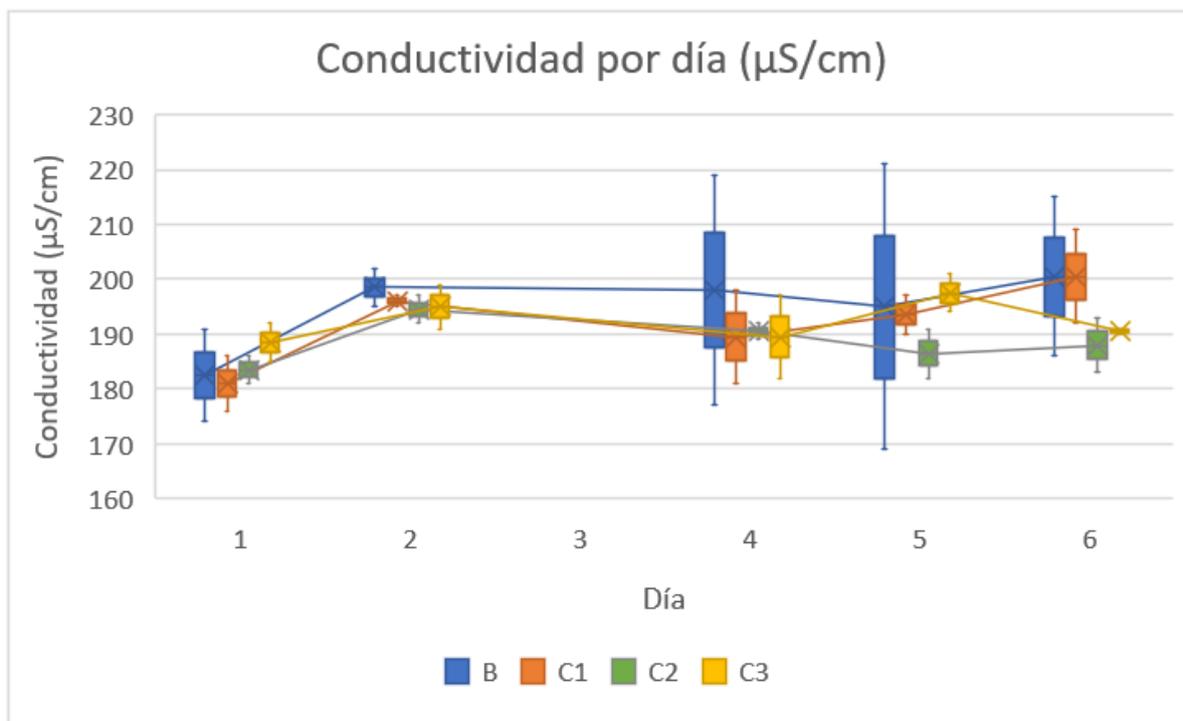


Figura 4. Conductividad tomada durante el tiempo de experimentación.

La conductividad varió entre 168 y 221 (Tabla 1). En los valores del ANOVA no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el tiempo de experimentación ($F=1.045$; $p=0.409$), ni tampoco entre tratamientos ($F=0.381$; $p=0.768$). En los dos primeros días se muestra una tendencia ascendente que se estabiliza desde el segundo a último día. En el blanco se denota una alta variabilidad en los tres últimos días y en C1, C2 y C3 no se muestra un patrón visible (Fig 4).

4.1.4 Oxígeno Disuelto

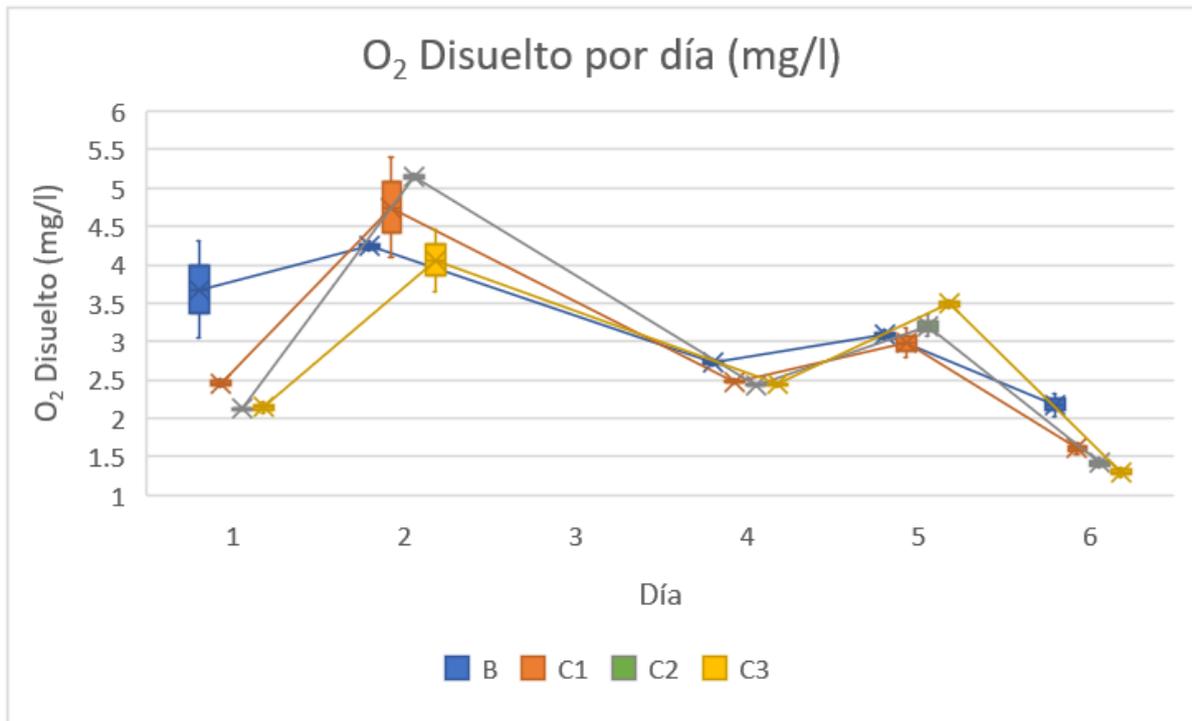


Figura 5. Oxígeno disuelto tomado durante el tiempo de experimentación.

Los valores de oxígeno disuelto oscilaron entre 1.24 y 5.4 (Tabla 1). En los valores del ANOVA si se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el tiempo de experimentación ($F=83.733$; $p<0.001$), y lo mismo ocurre entre tratamientos ($F=3.864$; $p=0.025$). A lo largo de los días de experimentación se denota una tendencia descendente con escasa desviación de datos (Fig 5). Esto pudo ser comprobado a través del análisis Post-Hoc del ANOVA (Anexo 1).

4.2 Mortalidad

Los valores de mortalidad diaria fluctúan entre 0 y 8. A nivel general, sin tomar en cuenta los tratamientos, Se tiene un promedio de mortalidad diaria de 2.083. La desviación estándar es alta mostrando una dispersión en los datos (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis Estadístico de mortalidad.

Mortalidad	
Promedio	2.083
P-value Shapiro-Wilk	< .001
Mínimo	0.000
Máximo	8.000

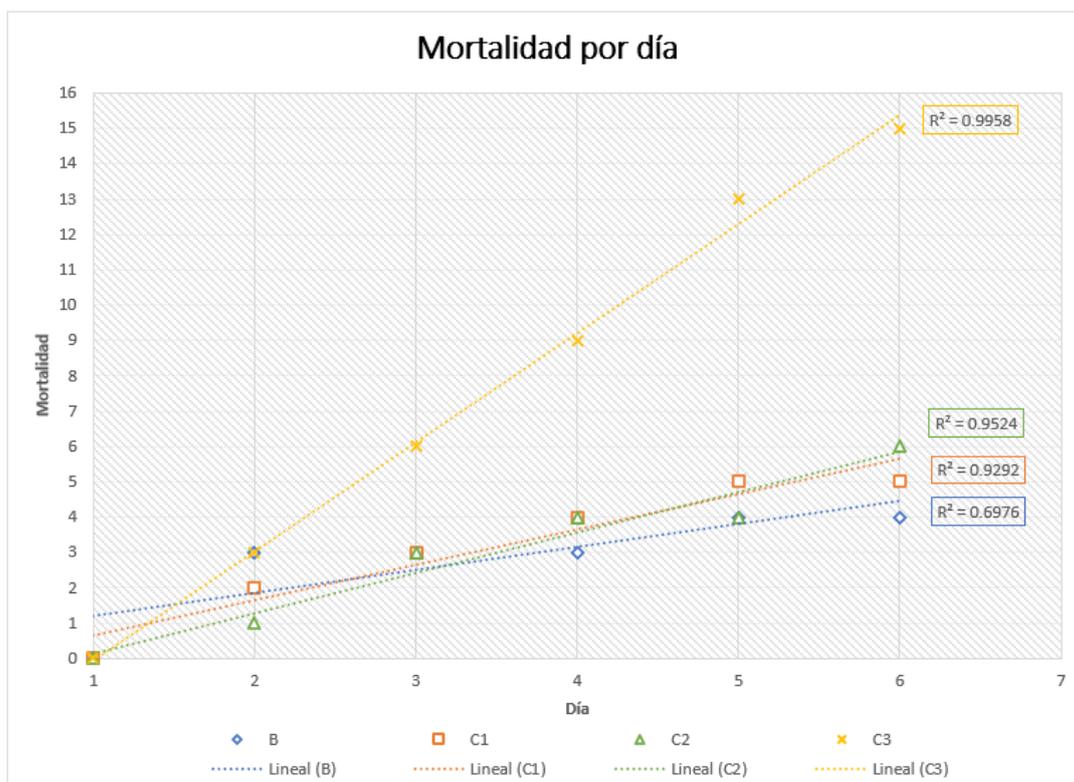


Figura 6. Mortalidad acumulada durante el tiempo de experimentación.

La mortalidad del género *Nectopsyche* está directamente relacionada a la concentración de mercurio y los días de experimentación. En los valores del ANOVA se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($F=5.612$; $p=0.002$). El análisis Post-Hoc, indica que la mortalidad acumulada en el tratamiento C3 es significativamente más elevada que en los demás tratamientos. Además, en los tratamientos C1 y C2, aunque su tendencia es similar a la del Blanco se muestra una mortalidad acumulada más elevada que en este tratamiento (Fig. 6), aunque en análisis Post Hoc no demuestra diferencias significativas (Tabla 3).

Tabla 3. Comparaciones Post Hoc con el Test de Tukey de la mortalidad entre tratamientos. SE= Error estandar,t= estadístico de Tukey y p= significancia del test

		Diferencia de la Media	SE	t	p _{tukey}
B	C1	-0.167	0.698	-0.239	0.995
	C2	-0.083	0.698	-0.119	0.999
	C3	-2.417	0.698	-3.464	0.006
C1	C2	0.083	0.698	0.119	0.999
	C3	-2.250	0.698	-3.225	0.012
C2	C3	-2.333	0.698	-3.344	0.009

4.3 Movilidad

La movilidad entre tratamientos e individuos tuvo patrones diferentes con una variación media (En el análisis estadístico se puede observar que los valores presentan una desviación estándar entre 1 y 2). Podemos ver que los parámetros de movilidad moderado y bajo tienen un máximo de 8 individuos por tratamiento y día e igualmente presentan promedios de 3.438 y 4.458 respectivamente, mayores que los valores del parámetro de movilidad alta presentan solamente un máximo de 5 individuos por tratamiento y día y un promedio de 2.021 (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis Estadístico de movilidad.

	Alto	Moderado	Bajo
Promedio	2.021	3.438	4.458
P-value Shapiro-Wilk	0.003	0.116	0.171
Mínimo	0.000	0.000	0.000
Máximo	5.000	8.000	8.000

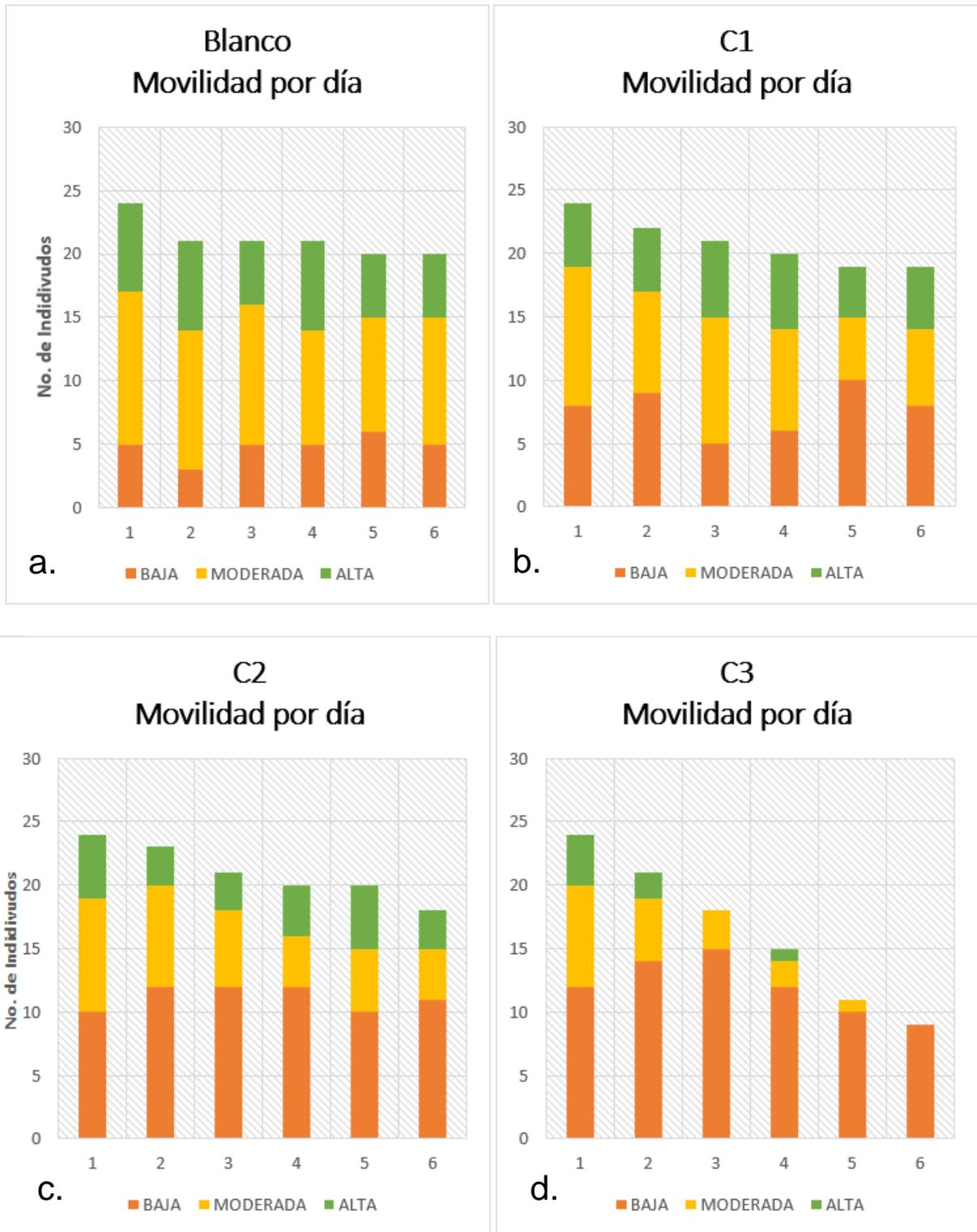


Figura 8. Movilidad de tratamientos durante el tiempo de experimentación

El gráfico presenta una distribución del parámetro de movilidad en los distintos tratamientos a lo largo del tiempo de experimentación. En los tratamientos C2 (Fig. 8c) y C3 (Fig. 8d) se puede observar una tendencia de los individuos a tener una movilidad baja a medida que se incrementa la concentración y a lo largo del tiempo, un comportamiento más acentuado en la C3 (Fig. 8d). En los tratamientos Blanco (Fig. 8a) y C1 (Fig. 8b) no se observa este fenómeno ya que los valores se mantienen estables a lo largo del tiempo de experimentación.

En el ANOVA de los tres niveles de movilidad se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. En el nivel de movilidad alta se presenta: $F=20.523$; $p<0.001$. En el nivel de movilidad moderada se presenta $F=14.781$; $p<0.001$. En el nivel de movilidad baja se presenta: $F=17.287$; $p<0.001$. Las diferencias entre número de individuos activos por tratamiento demuestran que a partir de la concentración C2, la actividad de los individuos se reduce significativamente (Tabla 5)

Tabla 5. Comparaciones Post Hoc con el Test de Tukey de la movilidad entre tratamientos. SE= Error estándar, t= estadístico de Tukey y p= significancia del test

		Diferencia de la Media	SE	t	p _{tukey}
B	C1	0.417	0.330	1.263	0.591
	C2	1.083	0.330	3.283	0.010
	C3	2.417	0.330	7.323	< .001
C1	C2	0.667	0.330	2.020	0.196
	C3	2.000	0.330	6.061	< .001
C2	C3	1.333	0.330	4.040	0.001

4.4 Bioacumulación

La bioacumulación se encuentra categorizada en dos parámetros: la concentración de mercurio en los individuos ($\mu\text{g/L}$) y el factor de bioacumulación (BAF). En el

tratamiento “blanco” no se detectó ni concentración de mercurio en los individuos ni BAF, demostrando que el río Alambí no tiene contaminación por mercurio, por esta razón fueron eliminados de los análisis posteriores. En los valores de concentración de mercurio en los individuos, se puede observar que el promedio tiende a incrementarse a medida que sube la concentración del tratamiento, esto no es tan visible en el BAF donde C2 y C3 tienen el mismo promedio. Los valores mínimos y máximos en la concentración de mercurio en los individuos, tienen una tendencia a incrementar. En el BAF se denota que los mínimos no tienen una tendencia marcada pero los máximos muestran un patrón de incremento a medida que sube la concentración del tratamiento (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis Estadístico de bioacumulación.

	Mercurio ($\mu\text{g/L}$)			BAF		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3
Promedio	0.086	0.181	1.811	0.860	0.907	0.906
Desviación Std.	0.805	0.875	0.971	0.805	0.875	0.971
P-value Shapiro-Wilk	0.092	0.196	2.036	0.920	0.980	1.018

4.4.1 Concentración de Mercurio

En el ANOVA del parámetro de bioacumulación no se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el tiempo de experimentación ($F=0.291$; $p=0.879$), sin embargo si se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($F=496.93$; $p<0.001$).

Se puede observar que el tratamiento C3 presenta una amplia diferencia en bioacumulación sobre los demás tratamientos (Tabla 7), además se denota una dispersión más pronunciada y un crecimiento conforme el avance en los días en esta concentración (Fig. 9d). La dispersión en C1 (Fig. 9b) y C2 (Fig. 9c) es menor y a su vez la bioacumulación tiene una tasa incremental a través de los días, pero no

tan pronunciada como en C3 (Fig. 9d). En el Blanco se denota una tendencia a incrementarse casi nula lo que va acorde a la no presencia de mercurio en este tratamiento (Fig. 9a).

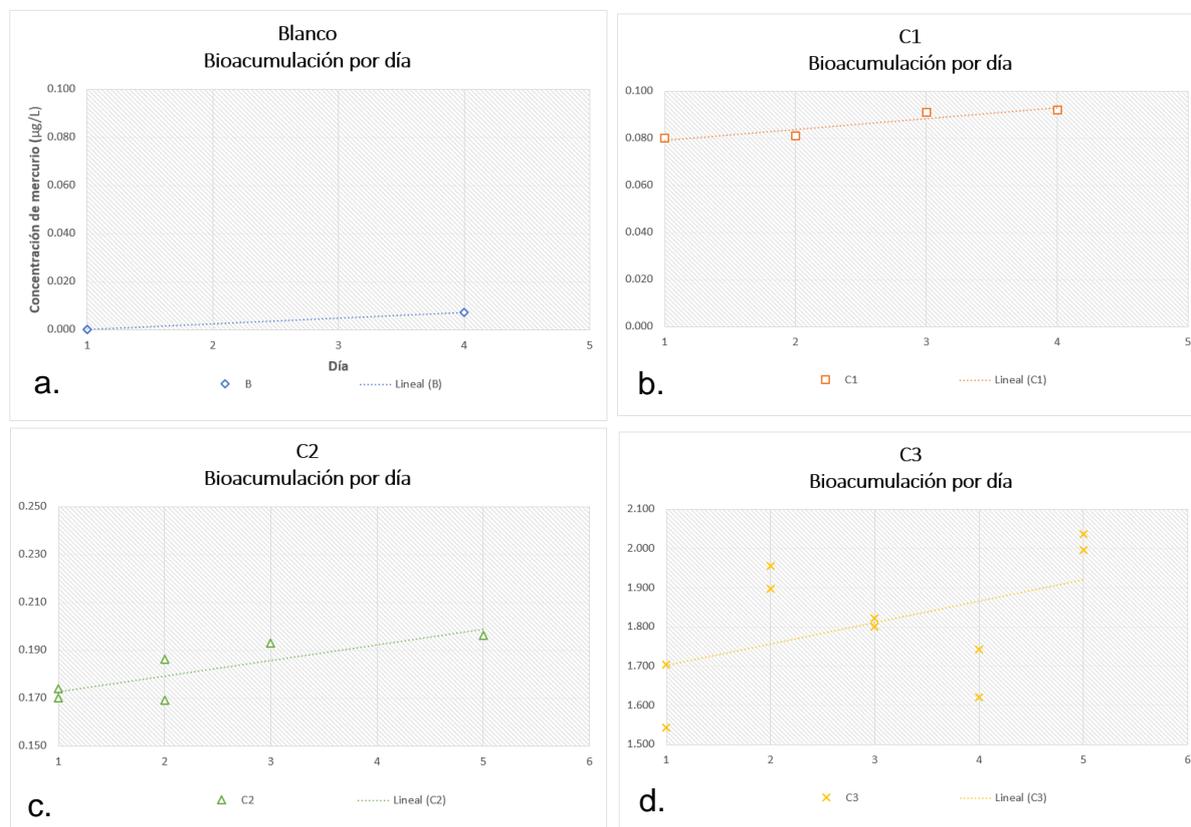


Figura 9. Bioacumulación durante el tiempo de experimentación

Tabla 7. Comparaciones Post Hoc con el Test de Tukey de la bioacumulación entre tratamientos. SE= Error estándar, t= estadístico de Tukey y p= significancia del test

		Diferencia de la Media	SE	t	p tukey
C1	C2	-0.095	0.076	-1.247	0.443
	C3	-1.725	0.070	-24.629	< .001
C2	C3	-1.630	0.061	-26.657	< .001

4.4.2 Factor de Bioacumulación (BAF)

En el ANOVA del factor de bioacumulación se encuentran diferencias estadísticamente significativas durante el tiempo de experimentación ($F=6.134$; $p=0.004$), por otra parte no se encuentra diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($F=0.65$; $p=0.535$), (Tabla 8). El factor de bioacumulación BAF en las concentraciones C1, C2 y C3 fluctúa entre valores de 0.771 y 1.018, mientras que en el Blanco es nulo. En cada tratamiento tiene una tendencia a incrementarse a lo largo que transcurre el tiempo de experimentación, de esta manera podemos observar que el BAF muestra valores más altos en el transcurso del tiempo de experimentación que entre tratamientos, esto se da ya que este discrimina la concentración en el medio (Fig. 10).

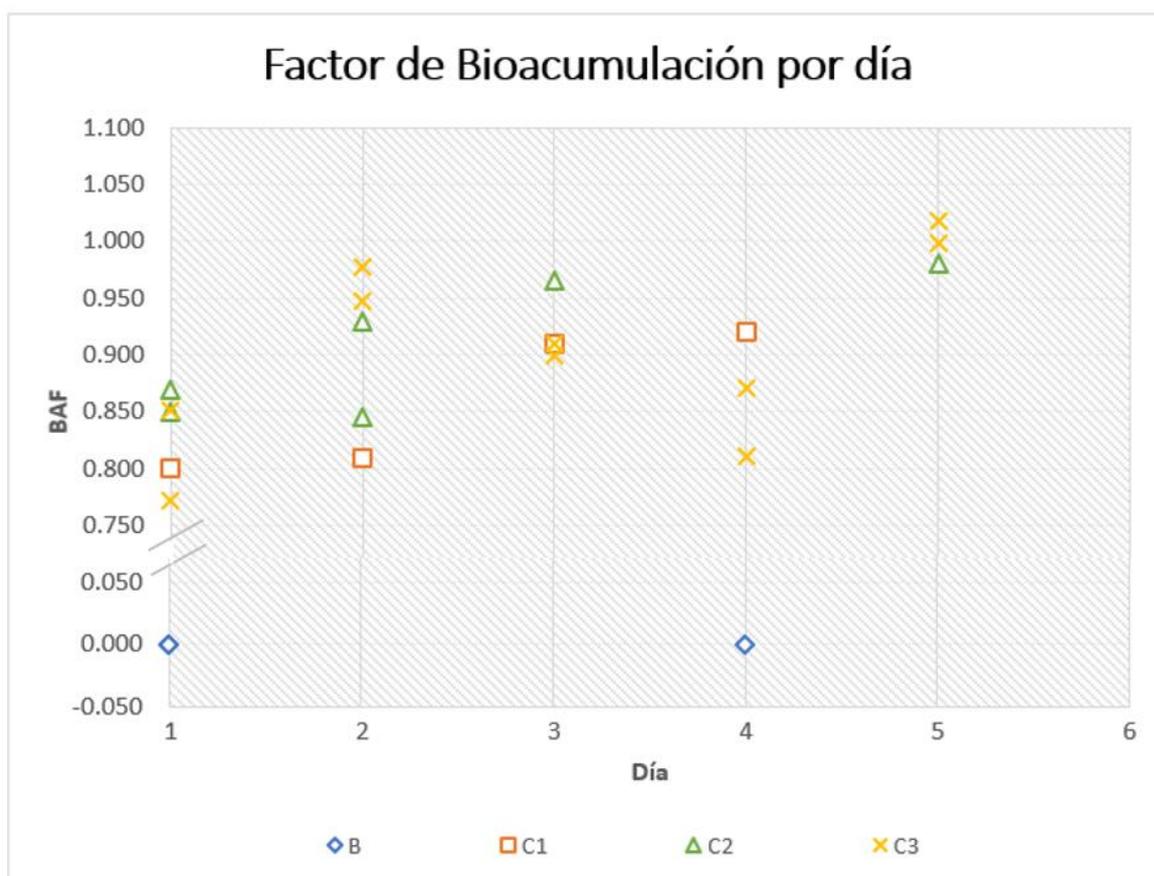


Figura 10. Valores de BAF a lo largo del tiempo de experimentación

Tabla 8. Comparaciones Post Hoc con el Test de Tukey de la mortalidad entre tratamientos. SE= Error estandar,t= estadístico de Tukey y p= significancia del test

		Diferencia de la Media	SE	t	p _{tukey}
C1	C2	-0.047	0.047	-0.999	0.588
	C3	-0.046	0.043	-1.069	0.545
C2	C3	8.667e -4	0.037	0.023	1.000

5. DISCUSIÓN

Los resultados del estudio realizado son conclusivos y tienen congruencia con la bibliografía estudiada. Los individuos del género *Nectopsyche* mostraron las respuestas esperadas en las variables presentadas comprobando así los efectos del uso del mercurio en la industria minera sobre ecosistemas acuáticos.

En el análisis de parámetros fisicoquímicos se denota que el pH y oxígeno disuelto tuvieron una relación directa hacia los tratamientos, es decir mostraron una tendencia de cambio a medida que la concentración de mercurio aumentaba o cuando los días transcurrían, por su parte la temperatura y conductividad no mostraron cambios.

El pH y la temperatura no presentaron variaciones considerables. La temperatura fue un parámetro controlado lo que permite simular el hábitat de los macroinvertebrados y no ser un factor de carácter estresor (Tomaila y Iannacone, 2018). La conductividad no presentó ninguna tendencia específica ya que es un factor ligado a cambios de temperatura y a sales presentes en el agua (Solís Castro et al., 2018). Sin embargo, estas variables fueron controladas, por una parte la temperatura con climatización y por otra se utilizó agua potable declorada con lo cual la concentración de sales era baja.

El oxígeno disuelto disminuye a lo largo del tiempo de experimentación en todos los tratamientos. Este fenómeno ocurre gracias a un incremento en la tasa de consumo de oxígeno por parte de los organismos al estar sometidos a un estresor como el mercurio. Como menciona Lemly (1993) la exposición continua a metales pesados es causante de cambios hematológicos y daños fisiológicos que reducen la capacidad respiratoria en peces, lo que nos hace presuponer la misma tendencia en los *Nectopsyche*. Estas afectaciones combinadas con un incremento en la demanda respiratoria y el consumo de oxígeno ocasionado por la alta actividad metabólica necesaria para adaptarse a un estresor son indicadores clave a considerar como causas en tasas de mortalidad elevadas. Eso se pudo evidenciar en el experimento relacionando el decrecimiento de oxígeno disuelto y la tasa de mortalidad presentada. Sin embargo, la disminución de oxígeno se produjo también en el blanco, pero no estuvo acompañada de alta mortalidad.

Para aislar la variable de concentración de mercurio en el agua y que la tasa de mortalidad no se vea afectada por factores de estrés por manipulación en el experimento, los individuos fueron sometidos a una aclimatación en los microcosmos 3 días antes de la experimentación. Los resultados nos muestran una relación directa entre la concentración de mercurio en el agua y la tasa de mortalidad. En las concentraciones 1 (0.0001 mg/L) y 2 (0.0002 mg/L) el incremento en mortalidad es bajo comparada al blanco, lo que significa que los individuos del género *Nectopsyche* tienen la capacidad de subsistir a estas concentraciones (Rossaro y Cortesi, 2013). En la concentración 3 (0.002 mg/L) se denota una tasa de mortalidad muy superior lo que nos hace inferir que a esta concentración el umbral de tolerancia a la toxicidad fue superado y se presentan efectos letales (Simpson, 2016). Los resultados obtenidos se los puede relacionar con lo que explica Canivet (2001) en su estudio, en el cual demostró un aumento de la toxicidad a lo largo del tiempo de la experimentación ya que los individuos son expuestos al xenobiótico por un período de exposición más largo.

En el parámetro de movilidad se observó una relación inversa a la concentración de mercurio. El mercurio genera una disminución periódica de la movilidad en los

individuos debido a un detrimento en los sistemas vitales en su organismo (Giusto, 2015). Esto se hace presente en la concentración 2 (0.0002 mg/L) y 3 (0.002 mg/L) donde la pasividad de individuos se vuelve más visible a lo largo que transcurre el tiempo de experimentación. Esta reducción en movilidad genera un déficit de interacción de los individuos con su medio deteriorando su capacidad de conseguir alimento, desarrollar su hábitat, interrelacionarse con demás poblaciones y protegerse de depredadores (Lundberg et al., 2003).

Los macroinvertebrados tienen la capacidad de bioacumular metales pesados presentes en su medio a través de procesos de adhesión y absorción (Parkman, 1993). La bioacumulación dentro de los individuos del género *Nectopsyche* en la experimentación es un parámetro concluyente que se encuentra interrelacionado con los demás parámetros observados. Por una parte, se denota que gracias a la biodisponibilización, la concentración de mercurio en los individuos aumenta a medida que aumenta la concentración en su medio (Chen, 2009). La toxicidad de metales pesados puede verse afectada por varios factores físicos o químicos, como la temperatura, pH, conductividad, la capacidad adsorción de los individuos expuestos, complejación con materia orgánica o intercambio gaseoso (Canivet et al., 2001). Por otra parte, se comprueba que la mortalidad está relacionada a la concentración de mercurio en los individuos y su nivel de tolerancia. Se observó que en la concentración 3 (0.002 mg/L) los datos muestra una tendencia con alta variabilidad, esto se da ya que el umbral de tolerancia al mercurio de los individuos es menor que la concentración (Henderson, 2012).

El factor de bioacumulación (BAF) es un parámetro que muestra la reactividad y tolerancia de individuos a una sustancia extraña presente en el medio y la capacidad de remanencia de esta sustancia en el organismo. El BAF presente en los individuos del género *Nectopsyche* es cercano a 1 lo que indica que la concentración encontrada en el organismo es igual a la concentración de su medio. De esta manera, se establece una relación directa entre el impacto del metal pesado sobre los individuos y los impactos generados a nivel ecosistémico. Esto define a los *Nectopsyche* como excelentes organismos bioindicadores y

descriptores del estado de impacto en el que su medio y ecosistema se encuentra (Johnson, 1993).

En los resultados se observa que la movilidad de C2 (0.0002 mg/L) y C3 (0.002 mg/L) muestran diferencias significativas frente al Blanco. Cabe recalcar C2 (0.0002 mg/L) es el límite de descarga admisible para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario del Anexo 1 del Libro IV del Texto Unificado Legislación Secundaria, Medio Ambiente (TULSMA, 2015). Lo que conlleva a que descargas realizadas a esta concentración son capaces de generar efectos subletales en la vida acuática, además en esta se denota una alta tasa de bioacumulación de mercurio que podría ser causante de la transferencia del metal pesado a seres humanos. Por su parte se denota que la mortalidad de C3 (0.002 mg/L) muestra diferencias significativas frente al Blanco, es necesario destacar que el parámetro es el nivel máximo de mercurio establecido por el Safe Drinking Water Act (EPA, 1991). En el caso de esta concentración, considerada segura para agua potable, la mortalidad observada es significativamente mayor a las demás concentraciones, por lo que causaría efectos abajo-arriba en las cadenas alimenticias fluviales a más de la interrupción de procesos ecológicos, como la descomposición de la hojarasca (ciclaje de nutrientes), de la cual, organismos como *Nectopsyche* son importantes (Allen, 2005)

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

El mercurio se presenta como un elemento químico tóxico al medio y organismos presentes en este. El metal pesado logró biodisponibilizarse a lo largo del tiempo de experimentación. A su vez, actúa como un estresor que aumenta la tasa de consumo de oxígeno en los organismos causando un agotamiento en el medio.

La tasa de mortalidad es directamente proporcional a la concentración de mercurio. Las concentraciones 1 (0.0001 mg/L) y 2 (0.0002 mg/L) muestran un incremento de mortalidad bajo mientras en que la concentración 3 (0.002 mg/L) se nota un incremento considerable significando un nivel de toxicidad mayor al rango de tolerancia de los individuos.

La tasa de movilidad es inversamente proporcional a la concentración de mercurio. El metal provoca una reducción progresiva de la capacidad locomotora de los individuos que se vuelve más visible a medida que se incrementa la concentración y transcurren los días de experimentación.

El factor de bioacumulación de los individuos del género *Nectopsyche* es cercano a 1 lo que significa que estos tienen la cualidad de ser bioindicadores al reaccionar de la misma forma que su medio, teniendo la capacidad de ser utilizados como herramientas de biomonitoreo.

6.2 Recomendaciones

Un aspecto esencial para la confiabilidad de resultados es la inocuidad de los recipientes donde se desarrolló el experimento. Las peceras de vidrio utilizadas como microcosmos tienen que ser lavadas con jabón industrial, ácido nítrico y alcohol para remover cualquier impureza que estas tengan. Las mangueras de los aireadores deben ser cambiadas por unas nuevas para evitar contaminación.

Los objetos de manipulación tienen que usarse de una manera para evitar contaminación cruzada entre los tratamientos. Se necesitan dos pinzas, una a ser utilizadas solamente para manipular los individuos en el blanco, y otra para los tratamientos con concentraciones. Además, en las concentraciones se tiene que manipular a los individuos en orden de ascendente concentración para evitar que concentraciones mayores contaminen a las menores.

Es esencial monitorear los parámetros fisicoquímicos constantemente y a una misma hora en el día, así se podrá reaccionar si un parámetro tiene un cambio repentino que pueda poner en riesgo la experimentación. Se recomienda, previo al inicio de la experimentación, tener una calibración de los equipos y durante la experimentación utilizar los mismos equipos de medición. De esta manera se evitan mediciones imprecisas e incongruentes durante la experimentación

Se recomienda revisar los niveles máximos permisibles para mercurio establecidos por la legislación ecuatoriana en la Tabla 3: Criterios de Calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario del Anexo 1 del Libro IV del Texto Unificado Legislación Secundaria, Medio Ambiente (TULSMA, 2015). Ya que se demuestra la presencia de efectos subletales dentro de esta concentración, con importantes niveles de bioacumulación, lo que tendría efectos abajo-arriba en los ecosistemas.

REFERENCIAS

- Aebi, H. (1974). *Catalase. Methods of Enzymatic Analysis*, 673–684. doi:10.1016/b978-0-12-091302-2.50032-3
- Allen, E. W., Prepas, E. E., Gabos, S., Strachan, W. M., & Zhang, W. (2005). *Methyl mercury concentrations in macroinvertebrates and fish from burned and undisturbed lakes on the Boreal Plain. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62(9), 1963–1977. doi:10.1139/f05-103
- Alonso, D., & Campos, N. (1999). *Biomagnification and bioaccumulation of mercury in two fish species from different trophic levels in the Bahía de Cartagena and the Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombian Caribbean* (No. IAEA-TECDOC--1094).
- Appleton, J. D., Williams, T. M., Orbea, H., & Carrasco, M. (2001). *Fluvial contamination associated with artisanal gold mining in the Ponce Enriquez, Portovelo-Zaruma, and Nambija areas, Ecuador. Water, Air, and Soil Pollution*, 131(1/4), 19–39. doi:10.1023/a:1011965430757
- Artiola, J., Pepper, I. L., & Brusseau, M. L. (2004). *Environmental monitoring and characterization*. Elsevier.
- Bohan, D. A., Vacher, C., Tamaddoni-Nezhad, A., Raybould, A., Dumbrell, A. J., & Woodward, G. (2017). *Next-generation global biomonitoring: large-scale, automated reconstruction of ecological networks. Trends in Ecology & Evolution*, 32(7), 477-487.
- Becker, D. S., & Bigham, G. N. (1995). *Distribution of mercury in the aquatic food web of Onondaga Lake, New York. Water, Air, & Soil Pollution*, 80(1-4), 563–571. doi:10.1007/bf01189706
- Bedregal, P., Mendoza, P., Ubillús, M., Torres, B., Hurtado, J., Maza, I., & Espinoza, R. (2009). *El uso de Usnea sp. y Tillandsia capillaris, como biomonitores de la contaminación ambiental en la ciudad de Lima, Perú. Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75(4), 479-487.

- Bisi, T. L., Lepoint, G., Azevedo, A. de F., Dorneles, P. R., Flach, L., Das, K., ... Lailson-Brito, J. (2012). *Trophic relationships and mercury biomagnification in Brazilian tropical coastal food webs*. *Ecological Indicators*, 18, 291–302. doi: 10.1016/j.ecolind.2011.11.015
- Braccia, A., & Voshell, J. R. (2006). *Environmental factors accounting for benthic macroinvertebrate assemblage structure at the sample scale in streams subjected to a gradient of cattle grazing*. *Hydrobiology*, 573(1), 55-73.
- Brusseu, M. L., & Artiola, J. F. (2019). *Chemical contaminants*. *Environmental and pollution science*, 175-190
- Canivet, P. Chambon, J. Gibert, V. (2001). *Toxicity and Bioaccumulation of Arsenic and Chromium in Epigeal and Hypogean Freshwater Macroinvertebrates*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40(3), 345–354.
- Chen, C. Y., Dionne, M., Mayes, B. M., Ward, D. M., Sturup, S., & Jackson, B. P. (2009). *Mercury Bioavailability and Bioaccumulation in Estuarine Food Webs in the Gulf of Maine*. *Environmental Science & Technology*, 43(6), 1804–1810. doi:10.1021/es8017122
- Calabrese, A., Thurberg, F., Gould, E. (1977). *Effects of Cadmium, Mercury, and Silver on Marine Animals*. Bélgica: Institute for Marine Scientific Research Prinses Elisabethlaan
- Chan, H., Scheuhammer, A., Ferran, A., Loupelle, C., Holloway, J., Weech, S. (2003). *Impacts of Mercury on Freshwater Fish-Eating Wildlife and Humans*. *Human and Ecological Risk Assessment*, 9(4)
- Chan, Y. H. (2003). *Biostatistics 104: correlational analysis*. *Singapore Med J*, 44(12), 614-9.
- Croteau, M. N., Luoma, S. N., & Stewart, A. R. (2005). *Trophic transfer of metals along freshwater food webs: evidence of cadmium biomagnification in nature*. *Limnology and Oceanography*, 50(5), 1511-1519.

- DePoy, E., & Gitlin, L. N. (1994). Introduction to research. *Multiple strategies for health and human services*. London: Mosby.
- Dinu, M., Pounis, G., & Sofi, F. (2019). Study Design in Experimental Settings. In *Analysis in Nutrition Research* (pp. 23-41). Academic Press.
- Eisler, R. (1987). *Mercury hazards to fish, wildlife, and invertebrates. A synoptic review*. U. S. Fish and Wildlife Service Patuxent Wildlife Research Center, Biological Report, 85(10)
- Emmanuel, A. (2013). *Impact of illegal mining on water resources on domestic and irrigation purposes*. Asian Research Publishing Network Vol. 2, No. 3
- Environmental Protection Agency. (1972). *Clean Drinking Water Act*. Public Health Service Act, 92-500(86).
- Environmental Protection Agency. (1991). *Safe Drinking Water Act*. Public Health Service Act, 14(373).
- Gagnon, C., & Fisher, N. S. (1997). *Bioavailability of Sediment-Bound Methyl and Inorganic Mercury to a Marine Bivalve*. *Environmental Science & Technology*, 31(4), 993–998. doi:10.1021/es960364k
- Garcia, E., Carignan, R., & Lean, D. R. S. (2006). *Seasonal and Inter-Annual Variations in Methyl Mercury Concentrations in Zooplankton from Boreal Lakes Impacted by Deforestation or Natural Forest Fires*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 131(1-3), 1–11. doi:10.1007/s10661-006-9442-z
- Gerhardt, A., Svensson, E., Clostermann, M., & Fridlund, B. (1994). *Monitoring of behavioral patterns of aquatic organisms with an impedance conversion technique*. *Environment International*, 20(2), 209-219.
- Giusto, A. (2014). *Efectos de la contaminación por metales pesados sobre anfípodos de agua dulce y su aplicación en estudios de toxicidad de sedimentos*. *Fcen.Uba.Ar*. Recuperado el 2 de mayo de 2019 de https://doi.org/https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5691_Giusto.pdf

- Goodyear, K. L., & McNeill, S. (1999). *Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macro-invertebrates of different feeding guilds: a review*. *Science of the Total Environment*, 229(1-2), 1-19.
- Gunson, A. J., Klein, B., Veiga, M., & Dunbar, S. (2012). *Reducing mine water requirements*. *Journal of Cleaner Production*, 21(1), 71–82. doi: 10.1016/j.jclepro.2011.08.020
- Henderson, B., Chumchal, M., Drenner, R., Deng, Y., Diaz, P., Nowlin, W. (2012). *Effects of fish on mercury contamination of macroinvertebrate communities of grassland ponds*. Estados Unidos: *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 31, No. 4, pp. 870–876
- Habeeb, A. F. S. A. (1972). *Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent*. *Methods in Enzymology*, 25, 457–464. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(72\)25041-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(72)25041-8)
- Higuera Gómez, M., & Gómez, R. (2018). *Comunidad de insectos acuáticos asociados a la hojarasca en el río Vista Mares de Alto de Cerro Azul, Provincia de Panamá, Panamá*. *Tecnociencia*, 20(1), 35-49.
- Hillwalker, W. E., & Anderson, K. A. (2014). *Bioaccessibility of metals in alloys: evaluation of three surrogate biofluids*. *Environmental pollution*, 185, 52-58.
- Holzenthal, R. W., Thomson, R. E., & Ríos-Touma, B. (2015). *Order Trichoptera*. *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates*, 965–1002. doi:10.1016/b978-0-12-385026-3.00038-3
- Hurley, J. P., Benoit, J. M., Babiarz, C. L., Shafer, M. M., Andren, A. W., Sullivan, J. R., ... Webb, D. A. (1995). *Influences of Watershed Characteristics on Mercury Levels in Wisconsin Rivers*. *Environmental Science & Technology*, 29(7), 1867–1875. doi:10.1021/es00007a026
- Ibelings, B. W., Bruning, K., De Jonge, J., Wolfstein, K., Pires, L. D., Postma, J., & Burger, T. (2005). *Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification*. *Microbial Ecology*, 49(4), 487-500.

- Illescas, R. (2018). *Perspectivas del sector minero en Ecuador*. Ecuador: Ministerio de Minería
- Instituto Nacional de Medicina y Seguridad del Trabajo. (1999). *Notas explicativas de ayuda al diagnóstico de las enfermedades profesionales*. Comisión Europea: Dirección General de Empleo, Relaciones Industriales y Asuntos Sociales, 20-22
- Johnson, R. K., Wiederholm, T., & Rosenberg, D. M. (1993). *Freshwater biomonitoring using individual organisms, populations, and species assemblages of benthic macroinvertebrates*. *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*, 40-158.
- Kouba, A., Buřič, M., & Kozák, P. (2010). *Bioaccumulation and effects of heavy metals in crayfish: a review*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 211(1-4), 5-16.
- Kotnik, J., Horvat, M., Tessier, E., Ogrinc, N., Monperrus, M., Amouroux, D., ... Pirrone, N. (2007). *Mercury speciation in surface and deep waters of the Mediterranean Sea*. *Marine Chemistry*, 107(1), 13–30. doi: 10.1016/j.marchem.2007.02.012
- Lemly, A. D. (1993). *Metabolic stress during winter increases the toxicity of selenium to fish*. *Aquatic Toxicology*, 27(1-2), 133-158.
- Ludeña, C., Wilk, D., & Deeb, A. (2012). Ecuador: Mitigación y adaptación al cambio climático. *Marco de la preparación de la Estrategia 2012 - 2017 del BID en Ecuador*. 14-21
- Lundberg, J., & Moberg, F. (2003). *Mobile link organisms and ecosystem functioning: implications for ecosystem resilience and management*. *Ecosystems*, 6(1), 0087-0098.
- Lynch, J. M., & Wiseman, A. (1998). *Environmental biomonitoring: The biotechnology ecotoxicology interface*. Cambridge University Press, New York. 299-312.

- Marcovecchio, J. E., Moreno, V. J., & Perez, A. (1986). *Bio-magnification of total mercury in Bahía Blanca Estuary shark*. Marine pollution bulletin, 17(6), 276-278.
- Martínez-Jerónimo, F., Espinosa, F. (2008). *Ensayo de toxicidad aguda con larvas y juveniles de los peces Brachydanio rerio y Poecilia reticulata*. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo, 1(8), 115-126.
- McAloon, K. M., & Mason, R. P. (2003). *Investigations into the bioavailability and bioaccumulation of mercury and other trace metals to the sea cucumber, Sclerodactyla briareus, using in vitro solubilization*. Marine pollution bulletin, 46(12), 1600-1608.
- Ministerio del Ambiente de Ecuador. (2015). *Anexo 1 del Libro IV del Texto Unificado Legislación Secundaria, Medio Ambiente*. Ecuador: Ministerio del Ambiente
- Ministerio del Ambiente de Ecuador. (2016). *Reforma al Reglamento Ambiental de Actividades Mineras. Registro Oficial No. 795*. Ecuador: Ministerio del Ambiente
- Malins, D. C. (2018). *Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives*. CRC Press.
- Moalla, S. M. N., Awadallah, R. M., Rashed, M. N., & Soltan, M. E. (1997). *Distribution and chemical fractionation of some heavy metals in bottom sediments of Lake Nasser*. Hydrobiology, 364(1), 31-40.
- Molina, C., Gibon, F., Sánchez, Y., Achá, D., Benefice, E., Guimaraes, J. (2010). *Implicancia ambiental del mercurio en ecosistemas acuáticos de la Amazonía: Situación en Bolivia*. Revista Virtual REDESMA 4(2), 25-42.
- Molina, C. I., Ibañez, C., & Gibon, F. M. (2012). *Proceso de biomagnificación de metales pesados en un lago hiperhalino (Poopó, Oruro, Bolivia): Posible riesgo en la salud de consumidores*. Ecología en Bolivia, 47(2), 99-118.

- Nahmani, J., & Rossi, J. P. (2003). *Soil macroinvertebrates as indicators of pollution by heavy metals*. *Comptes Rendus Biologies*, 326(3), 295-303.
- Narváez, M. (2012). Marco constitucional y legal de la minería metálica en el Ecuador. Ecuador: Universidad Andina Simón Bolívar
- Oviedo-Anchundia, R., Moina-Quimi, E., Naranjo-Morán, J., Barcos-Arias, M. (2017). *Contaminación por metales pesados en el sur del Ecuador asociada a la actividad minera*. Ecuador: Revista Bionatura, Vol 2, No. 4
- Page, R. M., Cole, G. E., & Timmreck, T. C. (1995). *Basic epidemiological methods and biostatistics: A practical guidebook*. Jones & Bartlett Learning.
- Parkman, H. Meili, M. (1993). *Mercury in Macroinvertebrates from Swedish Forest Lakes: Influence of Lake Type, Habitat, Life Cycle, and Food Quality*. Canada: *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 50, 521-534.
- Prat, N., Ríos-Touma, B., Acosta, R. (2009). *Los Macroinvertebrados como indicadores de calidad de las aguas, en "Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos"*. Fundación Miguel Lillo, 1(20), 631-654
- Pritchard, J. B. (1993). *Aquatic toxicology: past, present, and prospects*. *Environmental Health Perspectives*, 100, 249-257.
- Postma, J. F., Buckert-de Jong, M. C., Staats, N., & Davids, C. (1994). *Chronic toxicity of cadmium to Chironomus riparius (Diptera: Chironomidae) at different food levels*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26(2). doi:10.1007/bf00224797
- Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2007). *Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method*. *Nature Protocols*, 1(6), 3159–3165. doi:10.1038/nprot.2006.378
- Rimmer, C. C., Miller, E. K., McFarland, K. P., Taylor, R. J., & Faccio, S. D. (2009). *Mercury bioaccumulation and trophic transfer in the terrestrial food web of a montane forest*. *Ecotoxicology*, 19(4), 697–709.

doi:10.1007/s10646-009-0443-x

- Ríos-Touma, B., Acosta, R., & Prat, N. (2014). *The Andean Biotic Index (ABI): revised tolerance to pollution values for macroinvertebrate families and index performance evaluation*. *Revista de Biología Tropical*, 62, 249-273.
- Roman, Y. E., De Schamphelaere, K. A., Nguyen, L. T., & Janssen, C. R. (2007). *Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: Sensitivity comparison and preliminary risk assessment*. *Science of the Total Environment*, 387(1-3), 128-140.
- Rossaro, B., & Cortesi, P. (2013). *The effects of tricyclazole treatment on aquatic macroinvertebrates in the field and in laboratory*. *Environmental Monitoring*, 12, 21-43.
- Roulet, M., Lucotte, M., Canuel, R., Farella, N., Courcelles, M., Guimarães, J., Amorim, M. (2000). *Increase in mercury contamination recorded in lacustrine sediments following deforestation in the central Amazon. The present investigation is part of an ongoing study, the CARUSO project (CRDI-UFPa-UQAM), initiated to determine the sources, fate and health effects of the presence of MeHg in the area of the Lower Tapajós.1. Chemical Geology*, 165(3-4), 243–266. doi:10.1016/s0009-2541(99)00172-2
- Sala, M., Faria, M., Sarasúa, I., Barata, C., Bonada, N., Brucet, S., Llenas, L., Ponsá, S., Prat, N., Soares, A., Cañedo-Argüelles, M. (2016). *Chloride and sulphate toxicity to *Hydropsyche exocellata* (Trichoptera, Hydropsychidae): Exploring intraspecific variation and sub-lethal endpoints*. *Science of The Total Environment*, 566-567, 1032–1041. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.121
- Sandoval, F. (2011). *La Pequeña Minería en el Ecuador*. Ecuador: Mining, Minerals and Sustainable Development

- Scheuhammer, A., Graham, J. (1999). *The bioaccumulation of mercury in aquatic organisms from two similar lakes with differing pH*. *Ecotoxicology Journal*, 8(12), 49-56
- Scheuhammer, A. (1988). *Chronic toxicity of methylmercury in the Zebra Finch, *Poephila guttata**. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1(40), 123-30
- Scheuhammer, A., Wong, A., Bond, D. (1998). *Mercury and selenium accumulation in common loons (*Gavia immer*) and common mergansers (*Mergus merganser*) from eastern Canada*. *Environmental Toxicology Chemistry*, 17(1), 197-201
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). *An analysis of variance test for normality (complete samples)*. *Biometrika*, 52(3/4), 591-611.
- Silva-Forsberg, M., Forsberg, B., Zeidemann, V. (1999). *Mercury Contamination in Humans Linked to River Chemistry in the Amazon Basin*. *Ambio*, 28(6), 519-521
- Simpson, S. L., Campana, O., & Ho, K. T. (2016). *Sediment toxicity testing. In Marine ecotoxicology* (pp. 199-237). Academic Press.
- Siqueira, G. W., Aprile, F., Irion, G., & Braga, E. S. (2018). *Mercury in the Amazon basin: Human influence or natural geological pattern*. *Journal of South American Earth Sciences*, 86, 193–199. doi: 10.1016/j.jsames.2018.06.017
- Springer, M. (2010). Capítulo 3: Biomonitoring acuático. *Revista de Biología Tropical*, 58, 53-59.
- Solís-Castro, Y., Zúñiga-Zúñiga, L. A., y Mora-Alvarado, D. (2018). *La conductividad como parámetro predictivo de la dureza del agua en pozos y nacientes de Costa Rica*. *Revista Tecnología En Marcha*, 31(1), 35. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i1.3495>
- Soto-Jiménez, M. F. (2011). *Transferencia de elementos traza en tramas tróficas acuáticas*. *Hydrobiology*, 21(3), 239-248.

- Streets, D. G., Horowitz, H. M., Jacob, D. J., Lu, Z., Levin, L., ter Schure, A. F. H., & Sunderland, E. M. (2017). *Total Mercury Released to the Environment by Human Activities*. *Environmental Science & Technology*, 51(11), 5969–5977. doi: 10.1021/acs.est.7b00451
- Suedel, B. C., Boraczek, J. A., Peddicord, R. K., Clifford, P. A., & Dillon, T. M. (1994). *Trophic transfer and biomagnification potential of contaminants in aquatic ecosystems*. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 21-89). Springer, New York, NY.
- Thompson, S. K., & Cotner, J. B. (2018). *Bioavailability of Dissolved Organic Phosphorus in Temperate Lakes*. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 62.
- Tomaila, J., & Iannacone, J. (2018). *Toxicidad letal y subletal del arsénico, cadmio, mercurio y plomo sobre el pez Parachaeirodon innesi neon tetra (Characidae)*. *Revista de Toxicología*, 35, 95-105.
- Van Straalen, N. M., Donker, M. H., Vijver, M. G., & Van Gestel, C. A. M. (2005). *Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates*. *Environmental Pollution*, 136(3), 409-417.
- Wallace, J. B., & Webster, J. R. (1996). *The Role of Macroinvertebrates in Stream Ecosystem Function*. *Annual Review of Entomology*, 41(1), 115–139. doi:10.1146/annurev.en.41.010196.000555
- Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., & Peakall, D. B. (2012). *Principles of ecotoxicology*. CRC press.12-54
- Wiener, J. G., Krabbenhoft, D. P., Heinz, G. H., & Scheuhammer, A. M. (2003). *Ecotoxicology of mercury*. *Handbook of ecotoxicology*, 2, 409-463.
- Wright, D. J., & Verkerk, R. H. (1995). *Integration of chemical and biological control systems for arthropods: evaluation in a multitrophic context*. *Pesticide Science*, 44(3), 207-218.

- Zillioux, E. J., Porcella, D. B., & Benoit, J. M. (1993). *Mercury cycling and effects in freshwater wetland ecosystems*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(12), 2245–2264. doi:10.1002/etc.5620121208
- Žižek, S., Horvat, M., Gibičar, D., Fajon, V., & Toman, M. J. (2007). *Bioaccumulation of mercury in benthic communities of a river ecosystem affected by mercury mining*. *Science of The Total Environment*, 377(2-3), 407–415. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.02.010

ANEXOS

Anexo 1. Comparaciones Post Hoc significativas con el Test de Tukey del Oxígeno Disuelto entre tratamientos y días. SE= Error estándar= estadístico de Tukey y p= significancia del test

		Diferencia con la media	SE	t	p tukey
B, 1	C1, 5	-0.465	0.092	-5.081	0.005
	C2, 5	-0.625	0.092	-6.829	< .001
	C3, 5	-0.820	0.092	-8.959	< .001
	C1, 6	-0.450	0.092	-4.917	0.008
	C2, 6	-0.620	0.092	-6.774	< .001
	C3, 6	-0.625	0.092	-6.829	< .001
C1, 1	C1, 3	0.395	0.092	4.316	0.030
	C2, 5	-0.405	0.092	-4.425	0.023
	C3, 5	-0.600	0.092	-6.555	< .001
	C2, 6	-0.400	0.092	-4.370	0.026
	C3, 6	-0.405	0.092	-4.425	0.023
C2, 1	C2, 5	-0.435	0.092	-4.753	0.011
	C3, 5	-0.630	0.092	-6.883	< .001
	C2, 6	-0.430	0.092	-4.698	0.013
	C3, 6	-0.435	0.092	-4.753	0.011
C3, 1	C1, 3	0.400	0.092	4.370	0.026
	C2, 5	-0.400	0.092	-4.370	0.026
	C3, 5	-0.595	0.092	-6.501	< .001
	C2, 6	-0.395	0.092	-4.316	0.030
	C3, 6	-0.400	0.092	-4.370	0.026
B, 2	B, 4	-0.480	0.092	-5.244	0.004
	C1, 4	-0.425	0.092	-4.643	0.014
	B, 5	-0.475	0.092	-5.190	0.004
	C1, 5	-0.605	0.092	-6.610	< .001
	C2, 5	-0.765	0.092	-8.358	< .001
	C3, 5	-0.960	0.092	-10.489	< .001
	C1, 6	-0.590	0.092	-6.446	< .001

Anexo 1. Comparaciones Post Hoc significativas con el Test de Tukey del Oxígeno Disuelto entre tratamientos y días. SE= Error estándar= estadístico de Tukey y p= significancia del test

		Diferencia con la media	SE	t	p tukey
	C2, 6	-0.760	0.092	-8.304	< .001
	C3, 6	-0.765	0.092	-8.358	< .001
C1, 2	C1, 5	-0.430	0.092	-4.698	0.013
	C2, 5	-0.590	0.092	-6.446	< .001
	C3, 5	-0.785	0.092	-8.577	< .001
	C2, 6	-0.585	0.092	-6.392	< .001
	C3, 6	-0.590	0.092	-6.446	< .001
C2, 2	C2, 5	-0.500	0.092	-5.463	0.002
	C3, 5	-0.695	0.092	-7.593	< .001
	C2, 6	-0.495	0.092	-5.408	0.002
	C3, 6	-0.500	0.092	-5.463	0.002
C3, 2	C2, 5	-0.460	0.092	-5.026	0.006
	C3, 5	-0.655	0.092	-7.156	< .001
	C2, 6	-0.455	0.092	-4.971	0.007
	C3, 6	-0.460	0.092	-5.026	0.006
B, 3	C2, 5	-0.490	0.092	-5.354	0.003
	C3, 5	-0.685	0.092	-7.484	< .001
	C2, 6	-0.485	0.092	-5.299	0.003
	C3, 6	-0.490	0.092	-5.354	0.003
C1, 3	B, 4	-0.515	0.092	-5.627	0.001
	C1, 4	-0.460	0.092	-5.026	0.006
	C2, 4	-0.400	0.092	-4.370	0.026
	B, 5	-0.510	0.092	-5.572	0.002
	C1, 5	-0.640	0.092	-6.993	< .001
	C2, 5	-0.800	0.092	-8.741	< .001
	C3, 5	-0.995	0.092	-10.871	< .001
	B, 6	-0.410	0.092	-4.480	0.021

Anexo 1. Comparaciones Post Hoc significativas con el Test de Tukey del Oxígeno Disuelto entre tratamientos y días. SE= Error estándar= estadístico de Tukey y p= significancia del test

		Diferencia con la media	SE	t	p tukey
	C1, 6	-0.625	0.092	-6.829	< .001
	C2, 6	-0.795	0.092	-8.686	< .001
	C3, 6	-0.800	0.092	-8.741	< .001
C2, 3	B, 4	-0.450	0.092	-4.917	0.008
	C1, 4	-0.395	0.092	-4.316	0.030
	B, 5	-0.445	0.092	-4.862	0.009
	C1, 5	-0.575	0.092	-6.282	< .001
	C2, 5	-0.735	0.092	-8.030	< .001
	C3, 5	-0.930	0.092	-10.161	< .001
	C1, 6	-0.560	0.092	-6.118	< .001
	C2, 6	-0.730	0.092	-7.976	< .001
	C3, 6	-0.735	0.092	-8.030	< .001
C3, 3	B, 4	-0.480	0.092	-5.244	0.004
	C1, 4	-0.425	0.092	-4.643	0.014
	B, 5	-0.475	0.092	-5.190	0.004
	C1, 5	-0.605	0.092	-6.610	< .001
	C2, 5	-0.765	0.092	-8.358	< .001
	C3, 5	-0.960	0.092	-10.489	< .001
	B, 6	-0.375	0.092	-4.097	0.048
	C1, 6	-0.590	0.092	-6.446	< .001
	C2, 6	-0.760	0.092	-8.304	< .001
	C3, 6	-0.765	0.092	-8.358	< .001
B, 4	C3, 5	-0.480	0.092	-5.244	0.004
C1, 4	C3, 5	-0.535	0.092	-5.845	< .001
C2, 4	C2, 5	-0.400	0.092	-4.370	0.026
	C3, 5	-0.595	0.092	-6.501	< .001
	C2, 6	-0.395	0.092	-4.316	0.030

Anexo 1. Comparaciones Post Hoc significativas con el Test de Tukey del Oxígeno Disuelto entre tratamientos y días. SE= Error estándar= estadístico de Tukey y p= significancia del test

		Diferencia con la media	SE	t	p tukey
	C3, 6	-0.400	0.092	-4.370	0.026
C3, 4	C2, 5	-0.455	0.092	-4.971	0.007
	C3, 5	-0.650	0.092	-7.102	< .001
	C2, 6	-0.450	0.092	-4.917	0.008
	C3, 6	-0.455	0.092	-4.971	0.007
B, 5	C3, 5	-0.485	0.092	-5.299	0.003
C2, 5	B, 6	0.390	0.092	4.261	0.034
C3, 5	B, 6	0.585	0.092	6.392	< .001
B, 6	C2, 6	-0.385	0.092	-4.206	0.038
	C3, 6	-0.390	0.092	-4.261	0.034

Anexo 2. Comparaciones Post Hoc significativas con el Test de Tukey del pH entre tratamientos y días. SE= Error estándar= estadístico de Tukey y p= significancia del test

		Diferencia de la media	SE	t	p _{tukey}
B, 1	C2, 5	-0.625	0.092	-6.829	< .001
	C3, 5	-0.820	0.092	-8.959	< .001
	C1, 6	-0.450	0.092	-4.917	0.008
	C2, 6	-0.620	0.092	-6.774	< .001
	C3, 6	-0.625	0.092	-6.829	< .001
C1, 1	C1, 3	0.395	0.092	4.316	0.030
	C2, 5	-0.405	0.092	-4.425	0.023
	C3, 5	-0.600	0.092	-6.555	< .001
	C2, 6	-0.400	0.092	-4.370	0.026
	C3, 6	-0.405	0.092	-4.425	0.023
C2, 1	C2, 5	-0.435	0.092	-4.753	0.011
	C3, 5	-0.630	0.092	-6.883	< .001
	C2, 6	-0.430	0.092	-4.698	0.013
	C3, 6	-0.435	0.092	-4.753	0.011
C3, 1	C1, 3	0.400	0.092	4.370	0.026
	C2, 5	-0.400	0.092	-4.370	0.026
	C3, 5	-0.595	0.092	-6.501	< .001
	C2, 6	-0.395	0.092	-4.316	0.030
	C3, 6	-0.400	0.092	-4.370	0.026
B, 2	B, 4	-0.480	0.092	-5.244	0.004
	C1, 4	-0.425	0.092	-4.643	0.014
	B, 5	-0.475	0.092	-5.190	0.004
	C1, 5	-0.605	0.092	-6.610	< .001
	C2, 5	-0.765	0.092	-8.358	< .001
	C3, 5	-0.960	0.092	-10.489	< .001
	B, 6	-0.375	0.092	-4.097	0.048
	C1, 6	-0.590	0.092	-6.446	< .001
	C2, 6	-0.760	0.092	-8.304	< .001

Anexo 2. Comparaciones Post Hoc significativas con el Test de Tukey del pH entre tratamientos y días. SE= Error estándar= estadístico de Tukey y p= significancia del test

		Diferencia de la media	SE	t	p _{tukey}
	C3, 6	-0.765	0.092	-8.358	< .001
C1, 2	C1, 5	-0.430	0.092	-4.698	0.013
	C2, 5	-0.590	0.092	-6.446	< .001
	C3, 5	-0.785	0.092	-8.577	< .001
	C1, 6	-0.415	0.092	-4.534	0.018
	C2, 6	-0.585	0.092	-6.392	< .001
	C3, 6	-0.590	0.092	-6.446	< .001
C2, 2	C2, 5	-0.500	0.092	-5.463	0.002
	C3, 5	-0.695	0.092	-7.593	< .001
	C2, 6	-0.495	0.092	-5.408	0.002
	C3, 6	-0.500	0.092	-5.463	0.002
C3, 2	C2, 5	-0.460	0.092	-5.026	0.006
	C3, 5	-0.655	0.092	-7.156	< .001
	C2, 6	-0.455	0.092	-4.971	0.007
	C3, 6	-0.460	0.092	-5.026	0.006
B, 3	C2, 5	-0.490	0.092	-5.354	0.003
	C3, 5	-0.685	0.092	-7.484	< .001
	C2, 6	-0.485	0.092	-5.299	0.003
	C3, 6	-0.490	0.092	-5.354	0.003
C1, 3	B, 4	-0.515	0.092	-5.627	0.001
	C1, 4	-0.460	0.092	-5.026	0.006
	C2, 4	-0.400	0.092	-4.370	0.026
	B, 5	-0.510	0.092	-5.572	0.002
	C1, 5	-0.640	0.092	-6.993	< .001
	C2, 5	-0.800	0.092	-8.741	< .001
	C3, 5	-0.995	0.092	-10.871	< .001
	B, 6	-0.410	0.092	-4.480	0.021
	C1, 6	-0.625	0.092	-6.829	< .001
	C2, 6	-0.795	0.092	-8.686	< .001

Anexo 2. Comparaciones Post Hoc significativas con el Test de Tukey del pH entre tratamientos y días. SE= Error estándar= estadístico de Tukey y p= significancia del test

		Diferencia de la media	SE	t	p _{tukey}
C2, 3	C3, 6	-0.800	0.092	-8.741	< .001
	B, 4	-0.450	0.092	-4.917	0.008
	C1, 4	-0.395	0.092	-4.316	0.030
	B, 5	-0.445	0.092	-4.862	0.009
	C1, 5	-0.575	0.092	-6.282	< .001
	C2, 5	-0.735	0.092	-8.030	< .001
	C3, 5	-0.930	0.092	-10.161	< .001
	C1, 6	-0.560	0.092	-6.118	< .001
	C2, 6	-0.730	0.092	-7.976	< .001
C3, 3	C3, 6	-0.735	0.092	-8.030	< .001
	B, 4	-0.480	0.092	-5.244	0.004
	C1, 4	-0.425	0.092	-4.643	0.014
	B, 5	-0.475	0.092	-5.190	0.004
	C1, 5	-0.605	0.092	-6.610	< .001
	C2, 5	-0.765	0.092	-8.358	< .001
	C3, 5	-0.960	0.092	-10.489	< .001
	B, 6	-0.375	0.092	-4.097	0.048
	C1, 6	-0.590	0.092	-6.446	< .001
B, 4	C2, 6	-0.760	0.092	-8.304	< .001
	C3, 6	-0.765	0.092	-8.358	< .001
	C3, 5	-0.480	0.092	-5.244	0.004
C2, 4	C3, 5	-0.535	0.092	-5.845	< .001
	C2, 5	-0.400	0.092	-4.370	0.026
	C3, 5	-0.595	0.092	-6.501	< .001
C3, 4	C2, 6	-0.395	0.092	-4.316	0.030
	C3, 6	-0.400	0.092	-4.370	0.026
	C2, 5	-0.455	0.092	-4.971	0.007
	C3, 5	-0.650	0.092	-7.102	< .001
	C2, 6	-0.450	0.092	-4.917	0.008

Anexo 2. Comparaciones Post Hoc significativas con el Test de Tukey del pH entre tratamientos y días. SE= Error estándar= estadístico de Tukey y p= significancia del test

		Diferencia de la media	SE	t	p_{tukey}
	C3, 6	-0.455	0.092	-4.971	0.007
B, 5	C3, 5	-0.485	0.092	-5.299	0.003
C2, 5	B, 6	0.390	0.092	4.261	0.034
C3, 5	B, 6	0.585	0.092	6.392	< .001
B, 6	C2, 6	-0.385	0.092	-4.206	0.038
	C3, 6	-0.390	0.092	-4.261	0.034

