



**BENEMÉRITA Y CENTENARIA UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA AMBIENTAL



**EVALUACIÓN TÓXICA DEL OXICLORURO DE COBRE SOBRE LOS
BIOINDICADORES *Artemia franciscana*, *Scenedesmus intermedius* Y *Vibrio
fischeri*, SU COMPARATIVA CON SULFATO DE COBRE Y EL ESTUDIO EN
MEZCLAS BINARIAS CON GLIFOSATO**

TESIS

PRESENTA:

QFB GERARDO SOLÍS GONZÁLEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ASESORÍA: D. C. MARÍA CARMEN BARTOLOMÉ CAMACHO

COMITÉ TUTORAL:

D. C. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES

D. C. LUIS CHACÓN GARCÍA

D. C. MARTHA ESTRELLA GARCÍA PÉREZ

D. C. MA. GUADALUPE GARNICA ROMO

Morelia, Michoacán, mayo de 2022

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Toxicología Ambiental de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo dentro del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, bajo la asesoría de la Doctora en Ciencias María Carmen Bartolomé Camacho con la beca de maestría 759629 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).

ÍNDICE

ÍNDICE	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
AGRADECIMIENTOS	XII
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XIII
GLOSARIO	XV
RESUMEN	XX
ABSTRACT.....	XIX
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	4
MARCO TEÓRICO	5
CONTAMINACIÓN	5
CONTAMINACIÓN DEL AGUA	8
PLAGUICIDAS	12
EL USO DE PLAGUICIDAS EN MÉXICO.....	17
FUNGICIDAS CÚPRICOS	20
OXICLORURO DE COBRE	20
SULFATO DE COBRE.....	23
GLIFOSATO.....	25
ECOTOXICOLOGÍA Y EVALUACIÓN DE RIESGO AMBIENTAL (ERA): IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS DE TOXICIDAD INDIVIDUALES Y EN MEZCLA	29
BIOENSAYOS	34
BIOINDICADORES	35
IMPORTANCIA DE LOS INDICADORES BIOLÓGICOS	36
ZOOPLANCTON	36
<i>Artemia franciscana</i>	37
FITOPLANCTON	41
MICROALGAS VERDES	42
<i>Scenedesmus intermedius</i>	47
BACTERIAS MARINAS LUMINISCENTES	49

<i>Vibrio fischeri</i>	52
CAPÍTULO II.....	54
JUSTIFICACIÓN.....	55
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	57
HIPÓTESIS.....	57
OBJETIVOS	57
OBJETIVO GENERAL.....	57
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
CAPÍTULO III.....	59
MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
SUSTANCIA DE ENSAYO	60
AGUA MARINA SINTÉTICA	60
MEDIO DE CULTIVO BG-11	60
MATERIAL BIOLÓGICO.....	61
DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD DE <i>Artemia franciscana</i>	62
ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE <i>Scenedesmus intermedius</i>	63
BIOENSAYO DE TOXICIDAD SOBRE <i>Vibrio fischeri</i> POR BIOLUMINISCENCIA.....	65
ÍNDICE DE COMBINACIÓN	66
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	67
CAPÍTULO IV	68
RESULTADOS.....	69
ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DEL $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ SOBRE <i>Scenedesmus intermedius</i>	69
ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DEL CuSO_4 SOBRE <i>Scenedesmus intermedius</i>	70
ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DEL $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ SOBRE <i>Scenedesmus intermedius</i>	71
COMPARACIÓN DE LOS ÍNDICES DE TOXICIDAD DEL $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 Y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ SOBRE <i>Scenedesmus intermedius</i>	72
DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD DEL $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ SOBRE <i>Artemia franciscana</i>	73
DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD DEL CuSO_4 SOBRE <i>Artemia franciscana</i>	74
DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD DEL $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ SOBRE <i>Artemia franciscana</i>	75
COMPARACIÓN DE LOS ÍNDICES DE TOXICIDAD DEL $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 Y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ SOBRE <i>Artemia franciscana</i>	77
EFECTO DE LAS COMBINACIONES DE LOS PLAGUICIDAS $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 Y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ SOBRE <i>Scenedesmus intermedius</i>	78

EFFECTO DE LAS COMBINACIONES DE LOS PLAGUICIDAS $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 Y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ SOBRE <i>Artemia franciscana</i>	81
BIOENSAYO DE TOXICIDAD POR DISMINUCIÓN DE LA BIOLUMINISCENCIA DE LA BACTERIA MARINA <i>Vibrio fischeri</i>	84
DISCUSIÓN.....	85
CONCLUSIONES.....	96
REFERENCIAS	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de los usos del agua sobre su calidad. Tomado de Spiro & Stigliani, 2004.	10
Tabla 2. Categorización de las sustancias de acuerdo con la toxicidad aguda expresada en mg L ⁻¹ . Tomado de EPA, 1996.....	13
Tabla 3. Clasificación de plaguicidas según su naturaleza química.	14
Tabla 4. Consumo aparente de plaguicidas en México a partir de la producción más la importación menos la exportación en miles de toneladas. Tomado de INEGI, 2016.....	19
Tabla 5. Tipo de clorofila en microalgas y cianobacterias. Tomado de Miazek et al., 2015.	44
Tabla 6. Composición del medio BG-11 solución estéril, 100x concentrado (Fluka Analytical).	61
Tabla 7. Disposición de las muestras en al Peltier.....	65
Tabla 8. Categorización de sustancias de acuerdo con el índice de toxicidad expresado en mg L ⁻¹ . (EPA, 1996).	69
Tabla 9. Valores de la CI ₅₀ y NOEC del Cu ₂ (OH) ₃ Cl sobre <i>S. intermedius</i> tras siete días de exposición.....	69
Tabla 10. Valores de la CI ₅₀ y NOEC del CuSO ₄ sobre <i>S. intermedius</i> tras siete días de exposición.....	70
Tabla 11. Valores de la CI ₅₀ y NOEC del C ₃ H ₈ NO ₅ P sobre <i>S. intermedius</i> tras siete días de exposición.....	71
Tabla 12. Comparación de los índices de toxicidad del Cu ₂ (OH) ₃ Cl, CuSO ₄ y C ₃ H ₈ NO ₅ P sobre <i>S. intermedius</i> tras siete días de exposición.	72
Tabla 13. Valores de la CI ₅₀ y NOEC del Cu ₂ (OH) ₃ Cl sobre <i>A. franciscana</i> tras siete días de exposición.....	74
Tabla 14. Valores de la CI ₅₀ y NOEC del CuSO ₄ sobre <i>A. franciscana</i> tras siete días de exposición.....	75
Tabla 15. Valores de la CI ₅₀ y NOEC del C ₃ H ₈ NO ₅ P sobre <i>A. franciscana</i> tras siete días de exposición.....	76
Tabla 16. Comparación de los índices de toxicidad del Cu ₂ (OH) ₃ Cl, CuSO ₄ y C ₃ H ₈ NO ₅ P sobre <i>A. franciscana</i> tras 24 horas de exposición.	77
Tabla 17. Índice de Combinación (IC) de la Fracción afectada (Fa) para los combos Cu ₂ (OH) ₃ Cl/C ₃ H ₈ NO ₅ P y CuSO ₄ /C ₃ H ₈ NO ₅ P sobre <i>S. intermedius</i>	78
Tabla 18. Valores de las CI ₅₀ y 7d-NOEC de los plaguicidas y sus combinaciones sobre la microalga verde <i>Scenedesmus intermedius</i>	80

Tabla 19. Índice de Combinación (IC) de la Fracción afectada (Fa) para los combos $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre <i>A. franciscana</i>	81
Tabla 20. Valores de las CL_{50} y 24h-NOEC de los plaguicidas y sus combinaciones sobre el microcrustáceo <i>A. franciscana</i>	83
Tabla 21. Valores de la CE_{50} y NOEC del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ sobre la bacteria marina <i>V. fischeri</i> , por exposición aguda.	84
Tabla 22. Concentración o Efecto letal medio (CL_{50} o CE_{50}) del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ sobre organismos acuáticos.	88
Tabla 23. Toxicidad del cobre y compuestos basados en cobre sobre diferentes especies marinas.	89
Tabla 24. Toxicidad aguda del Cu sobre ocho bioindicadores marinos.	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Macroestructura de contaminación ambiental. Tomado de Pursitasari et al., 2019.	6
Figura 2. Ciclo del agua. Tomado de Barceló & López, 2007.....	9
Figura 3. Fuentes de contaminación no puntuales. Tomado de WordPress.....	11
Figura 4. Caldo bordelés preparado a partir de CuSO_4 , cal hidratada y agua.	12
Figura 5. Ciclo de los plaguicidas en el medio ambiente. Tomado de Nueva tribuna (2020).	13
Figura 6. Tóxicos en la cadena trófica y principales formas de concentración en los organismos.....	16
Figura 7. Cadena trófica marina y concentración de sustancias tóxicas hasta el humano. ..	17
Figura 8. Modo de acción de los fungicidas. Tomado de Bayer, 2022.....	20
Figura 9. Mildiu de la vid. Tomado de Viver-vid (2022).	21
Figura 10. Preparación artesanal de $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ y su aplicación en huertas de aguacate de Michoacán.	22
Figura 11. Ciclo del mildiu y partes fúngicas atacadas de acuerdo con la actividad del fungicida. Tomado de BASF (2020).....	22
Figura 12. Contaminación y persistencia de CuSO_4 en un cuerpo de agua utilizado para la acuicultura tras ser desecado. Tomado de WordPress (2020).....	24
Figura 13. Distribución de plaguicidas y herbicidas importados a México.	27
Figura 14. Principales herbicidas utilizados en el México.	27
Figura 15. Sal isopropilamina de glifosato.....	28
Figura 16. Inhibición de la enzima EPSPS. Tomado de Glyphosate facts (2013).	29
Figura 17. Diagrama general para la planificación e implantación de la evaluación de riesgo ambiental.	32
Figura 18. Morfología de Artemia. Tomado de Neli (2015).....	38
Figura 19. Estadios de la eclosión de Artemia. Tomado de Aquaria (2018).	39
Figura 20. Ciclo de vida de Artemia. Tomado de Neli (2015).....	39
Figura 21. Mapa de distribución de Artemia. Tomado de Muñoz (2009).	40
Figura 22. Morfología de algunos tipos de microalgas dulceacuícolas. Tomado de Frontera (2021).....	42
Figura 23. Mecanismo y diferentes grupos funcionales que participan en la biosorción de iones metálicos en microalgas (SH^- , COO^- , OH^- , PO_4^- , etcétera). Tomado de Zeraatkar et al., 2016.....	46

Figura 24. Especies de Scenedesmus. Tomado de Bellinger & Sigeo (2015).....	47
Figura 25. Morfología de Scenedesmus intermedius. Tomado de Bellinger & Sigeo (2015).	48
Figura 26. Tipos de emisión de luminiscencia en los seres vivos. Tomado de Martín et al. (2010).	50
Figura 27. Emisión de luz dependiente de la enzima luciferasa. Tomado de Martín et al. (2010).	51
Figura 28. Control por quorum sensing de la bioluminiscencia en <i>V. fischeri</i> . Tomado de Martín et al. (2010).	52
Figura 29. Diagrama de la obtención de nauplios de <i>A. franciscana</i> de 24 horas.	62
Figura 30. Diagrama del procedimiento descrito por Persoone et al. (1989), para la determinación de mortalidad de <i>A. franciscana</i>	63
Figura 31. Diagrama del procedimiento descrito por la Directriz 201 de la OECD (2001) para la utilización de <i>S. intermedius</i> en pruebas de toxicidad aguda.	64
Figura 32. Diagrama del procedimiento base para la obtención de <i>V. fischeri</i> e interpretación de la toxicidad de un xenobiótico a partir de los cambios en la intensidad de bioluminiscencia.	66
Figura 33. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de <i>S. intermedius</i> con el fungicida $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$	70
Figura 34. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de <i>S. intermedius</i> con el fungicida y alguicida CuSO_4	71
Figura 35. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de <i>S. intermedius</i> con el herbicida $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$	72
Figura 36. Comparación de los índices de toxicidad del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre <i>S. intermedius</i>	73
Figura 37. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de <i>A. franciscana</i> con el fungicida $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$	74
Figura 38. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de <i>A. franciscana</i> con el fungicida y alguicida CuSO_4	75
Figura 39. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de <i>A. franciscana</i> con el fungicida y alguicida $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$	76
Figura 40. Comparación de los índices de toxicidad del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre <i>A. franciscana</i>	78
Figura 41. Relación de la Fracción afectada (Fa) – Índice de Combinación (IC) de las mezclas de $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre <i>S. intermedius</i>	79

Figura 42. Respuesta lineal individual del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$, y las mezclas de $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre <i>S. intermedius</i>	80
Figura 43. Relación de la Fracción afectada (Fa) – Índice de Combinación (IC) de las mezclas de $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre <i>A. franciscana</i>	82
Figura 44. Respuesta lineal individual del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$, y las mezclas de $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre <i>A. franciscana</i>	83
Figura 45. Respuesta del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ sobre la bioluminiscencia de la bacteria marina <i>V. fischeri</i>	85

“Todas las sustancias son venenos, no existe ninguna que no lo sea. La dosis diferencia un veneno de un remedio.”

Paracelso

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo para la realización de este trabajo de investigación.

A mi asesora la Dra. Carmen Bartolomé, por su guía, apoyo, consejo y paciencia para conmigo y así llevar a término este trabajo de tesis.

De igual manera, quiero agradecer a mi comité sinodal, a la Dra. Martha García, Dra. Guadalupe Garnica, Dr. Héctor Martínez y Dr. Luis Chacón, por su apoyo incondicional, su tiempo, sus sugerencias y correcciones, para poder culminar con este proyecto de investigación.

A mi madre, María de Jesús González; mi padre, Ariel Solís; mi hermana, Yesenia Solís; y a toda mi familia, por ser un gran soporte en mi vida como estudiante y apoyarme a no rendirme y perseguir mis sueños.

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

24h-NOEC	Concentración Máxima sin Efecto Observado tras 24 horas de exposición
7d-NOEC	Concentración Máxima sin Efecto Observado tras siete días de exposición
BG-11	<i>Blue-Green Medium</i>
CE₅₀	Concentración Efectiva media
CI₅₀	Concentración Inhibitoria media
CI_{50(7d)}	Concentración Inhibitoria media tras siete días de exposición
CL₅₀	Concentración Letal media
CL_{50(24h)}	Concentración Letal media tras 24 horas de exposición
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
COP	Compuestos Orgánicos Persistentes
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> . Agencia de Protección Ambiental
EPSPS	5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa
Fa.	Fracción afectada
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> . Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer
IC	Índice de Combinación
IPA	Isopropilamina
IPCS	<i>International Program on Chemical Safety</i> . Programa Internacional de Seguridad Química
NOEC	<i>No Observed Effect Concentration</i> . Concentración sin Efecto Observado
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i> . Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

OGM	Organismos Genéticamente Modificados
PANI	<i>Pesticide Action Network International</i> . Red de Acción de Plaguicidas Internacional
PAP	Plaguicidas Altamente Peligrosos
POEA	Polioxietilenamina
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
WHO	<i>World Health Organization</i> . Organización Mundial de la Salud

GLOSARIO

Absorción (biológica). Proceso de entrada o transporte, activo o pasivo, de una sustancia al interior de un organismo; puede tener lugar a través de diferentes vías.

Acumulación. Sucesivas retenciones de una sustancia por un organismo diana, un órgano o una parte del medio ambiente, que conducen a un aumento de la cantidad o la concentración de la sustancia en los mismos.

Adaptación. Cambios en un organismo como respuesta a variaciones de las condiciones del ambiente que se producen sin ninguna alteración irreversible del sistema biológico y sin exceder la capacidad normal de respuesta (homeostasis).

Aguas residuales. Son las aguas de composición variada provenientes de las descargas municipales, industriales, comerciales, agrícolas, pecuarias, domésticas y en general de cualquier otra.

Agudo. Exposiciones o efectos a corto plazo. En toxicología experimental, estudios de corta duración, normalmente de 24 h o de dos semanas o menos, iniciados por la administración de una dosis única.

Arvenses. Plantas sin valor económico o que crecen fuera de lugar interfiriendo en la actividad de los cultivos, afectando su capacidad de producción y desarrollo normal por la competencia de agua, luz, nutrientes y espacio físico, o por la producción de sustancias nocivas para el cultivo.

BG-11 (Blue-Green Medium). Medio de enriquecimiento para microalgas de agua dulce y protozoarios.

Bioacumulación. Aumento progresivo de la cantidad de sustancia de un organismo o parte de él, como consecuencia de que el ritmo de absorción supera la capacidad del organismo para eliminar la sustancia. Las sustancias bioacumulables alcanzan concentraciones crecientes a medida que se avanza en el nivel trófico.

Biodegradación. Destrucción *in vivo* o *in vitro* de una sustancia, por acción enzimática. Puede caracterizarse como: 1. Primaria. La alteración de la estructura química de la sustancia que supone la pérdida de una propiedad específica. 2. Aceptable desde el punto de vista

ambiental. Se eliminan propiedades indeseables del compuesto. 3. Total. La sustancia se transforma completamente en moléculas o iones simples (como dióxido de carbono, metano, nitrato, amonio, agua, etcétera).

Biodisponibilidad. Proporción de la dosis que una sustancia absorbida por cualquier vía alcanza en la circulación sistémica.

Bioensayo. Procedimiento para evaluar la actividad biológica, la presencia o la cantidad de una sustancia (tóxico, toxina, hormona, antibiótico, etcétera) mediante la medida de sus efectos sobre un organismo o cultivo celular en comparación con una preparación estándar apropiada.

Biomagnificación. Secuencia de procesos que conducen a aumentar la concentración de una sustancia en un organismo con respecto a la de medio que lo ha aportado. Acumulándose de forma creciente a lo largo de la cadena trófica. Se suele aplicar más a los ecosistemas que a los individuos.

Biotransformación. Reacciones que convierten los tóxicos en especies químicas distintas que pueden ser menos o más tóxicas que el compuesto original.

Cadena trófica. 1. Secuencia de transferencia de materia y energía en forma de alimento de organismo en organismo en niveles tróficos ascendentes o descendientes. 2. Serie de organismos que se alimentan unos de otros, en cuya sucesión se transmiten y concentran, entre otras, sustancias tóxicas.

Concentración. Cantidad de una sustancia, expresada en peso o en moles (S), por unidad de peso o volumen de medio en que se encuentra ($C = S \text{ Kg}^{-1}$; $C = S \text{ L}^{-1}$). Puede expresarse como porcentaje (riqueza). No es sinónimo de dosis.

Concentración Efectiva (CE). Proporción de una sustancia en un medio que causa un determinado efecto en un sistema dado.

Concentración Efectiva media (CE₅₀). Concentración, calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que causa el 50 % del efecto máximo.

Concentración Inhibitoria (CI). Proporción de una sustancia en un medio que causa la inhibición de crecimiento de un organismo o cultivo de este.

Concentración Inhibitoria media (CI₅₀). Concentración, calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que se espera inhiba el crecimiento a la mitad en la cantidad de organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas.

Concentración Letal (CL). Proporción de una sustancia tóxica en un medio, que causa la muerte después de un cierto periodo de exposición.

Concentración Letal media (CL₅₀). Concentración, calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que se espera que mate al 50 % de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas.

Concentración-respuesta, curva. Gráfico que relaciona la concentración de la exposición y la proporción de individuos de la población que manifiesta un efecto determinado.

Concentración sin Efecto Observado (NOEC). Máxima concentración, en términos de porcentaje, a la cual los organismos de ensayo son expuestos y no causa un efecto adverso determinado bajo condiciones idénticas a las de exposición.

Contaminante. 1. Agente microbiano indebidamente presente en un medio. 2. Impureza menor presente en una sustancia. 3. Material extraño inadvertidamente añadido a una muestra antes o durante el análisis químico o biológico. 4. Componentes indeseables en el medio ambiente.

Criptobiosis. Estado fisiológico en el que la actividad metabólica se reduce a un nivel indetectable sin desaparecer del todo. Es conocido en ciertos grupos de plantas y animales adaptados para sobrevivir periodos de condiciones extremadamente secas.

Diapausa. *Ver criptobiosis.*

Dosis. Cantidad de sustancia administrada o absorbida por un individuo en proporción a su peso o volumen corporal, ordinariamente en 24 h.

Dosis-respuesta, curva. Expresión gráfica de la relación entre la dosis y la proporción (%) de los individuos de una población que experimentan o no un efecto determinado.

Ecosistema acuático. Es la unidad funcional básica de interacción de los organismos vivos entre sí y de estos con el ambiente acuático en un espacio y tiempo determinado.

Efecto. Cambio biológico, tanto en organismos individuales como a niveles superiores de organización; se relaciona con la exposición a un xenobiótico.

Efluente. Líquido, sólido o gas emitido o descargado desde una fuente al medio ambiente.

Ensayos. 1. En toxicología analítica: análisis cualitativo o cuantitativo por aplicación de métodos establecidos y la comparación de los resultados con estándares previstos. 2. En toxicología experimental: evaluación de los efectos tóxicos potenciales de las sustancias mediante su aplicación, a diferentes dosis, a organismos apropiados o sistemas biológicos por vías adecuadas de exposición o administración.

Ensayo de toxicidad. Estudio experimental de los efectos adversos de una sustancia sobre un organismo vivo, durante un tiempo determinado y bajo condiciones definidas.

Ensayos de toxicidad aguda. Estudio experimental para determinar los efectos adversos que pueden aparecer en un corto periodo después de una dosis única de una sustancia o de varias dosis administradas en 24 h.

Hormesis. 1. Fenómeno de relación entre la dosis y la respuesta, caracterizada por estimulación a bajas dosis e inhibición con altas dosis, ha sido frecuentemente observada en estudios adecuadamente diseñados y es ampliamente generalizable como independiente de los agentes fisicoquímicos, el modelo biológico y el objeto de evaluación. 2. Respuesta adaptativa caracterizada por una dosis-respuesta bifásica (activación-inhibición) que puede ser, o bien directamente inducida, dependiendo del rango y amplitud del estímulo, o bien el resultado de procesos biológicos compensatorios que aparecen después de una disrupción en la homeostasis celular o del organismo.

Índices de toxicidad. Expresan los resultados de diferentes ensayos de toxicidad como un único valor numérico que clasifica a la muestra.

Peligro. Posibilidad de que un agente produzca efectos dañinos, a causa de sus propiedades específicas, a las circunstancias y grado de la exposición.

Riesgo. Probabilidad de que se produzcan efectos adversos o daños por exposición a un agente tóxico, a causa de las propiedades inherentes del mismo y a las circunstancias o grados de la exposición.

Sensibilidad especie-específica. Características cualitativas y cuantitativas de respuesta a sustancias potencialmente tóxicas que son distintivas de especies particulares de organismos.

Toxicidad. Capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad de sustancias administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetidas), tipo y severidad del daño, tiempo necesario para producir este, la naturaleza del organismo afectado y otras condiciones intervinientes.

Toxicidad aguda. Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos dentro de un corto periodo (usualmente hasta 14 días) después de la administración de una dosis única o tras dosis o exposiciones múltiples en 24 h.

Tóxico. Cualquier agente químico o físico capaz de producir un efecto adverso para la salud. Todos los agentes físicos y químicos son tóxicos potenciales, ya que su acción depende de la dosis y de las circunstancias individuales y ambientales.

Xenobiótico. Cualquier sustancia sintetizada químicamente que interactúa con un organismo produciendo un efecto adverso sobre el organismo.

RESUMEN

El presente trabajo de tesis integra los resultados de investigación sobre el uso de plaguicidas inorgánicos basados en cobre; oxiclорuro de cobre $[\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}]$, sulfato de cobre (CuSO_4) y su mezcla con glifosato ($\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$), examinando el daño sobre los ecosistemas acuáticos en términos de toxicidad aguda a través de índices de toxicidad como la Concentración Letal media (CL_{50}), la Concentración Inhibitoria media (CI_{50}) y Concentración Efectiva media (CE_{50}) por medio de bioensayos con bioindicadores del primer nivel trófico: microcrustáceo *Artemia franciscana*, microalga verde *Scenedesmus intermedius* y la bacteria marina *Vibrio fischeri*. Los resultados obtenidos en la exposición aguda con $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ sobre *A. franciscana* muestran una $\text{CL}_{50(24)}$ de 76.21 mg L^{-1} que, de acuerdo con la clasificación de la Agencia de Protección de los Estados Unidos (US-EPA), fue de categoría III determinándolo como sustancia peligrosa para el ambiente acuático al igual que sobre el alga *S. intermedius* con resultado en la $\text{CI}_{50(7d)}$ de 40.86 mg L^{-1} . Además, se realizó un análisis comparativo utilizando otro fungicida-alguicida de uso común, el CuSO_4 que, en su respuesta sobre *A. franciscana*, obtuvo una $\text{CL}_{50(24)}$ de 34.04 mg L^{-1} , perteneciendo por igual a la categoría III de sustancias peligrosas para organismos acuáticos; sin embargo, sobre el alga *S. intermedius* alcanzó una $\text{CI}_{50(7d)}$ de 2.86 mg L^{-1} lo que la clasifica en la categoría II como sustancia tóxica para el ambiente acuático por la US-EPA.

En el caso del $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ el resultado fue de mayor toxicidad sobre el bioindicador *A. franciscana*, donde se obtuvo una $\text{CL}_{50(24)}$ de 0.31 mg L^{-1} que lo clasifica en la categoría I de la US-EPA como sustancia muy tóxica para el ambiente acuático; aunque sobre el alga *S. intermedius*, el resultado obtenido de la $\text{CI}_{50(7d)}$ de 4.28 mg L^{-1} lo incluye dentro de la categoría II como una sustancia tóxica para el ambiente acuático al igual que ocurría con el CuSO_4 .

Por último, el estudio de la disminución de bioluminiscencia en la bacteria marina *V. fischeri*, con una CE_{50} de 12.68 mg L^{-1} demuestra que fue el más sensible al $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$. Al realizar la comparación de la toxicidad de los plaguicidas individualmente y en mezcla, los resultados dieron una sensibilidad sobre *S. intermedius*: $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{Gli} > \text{CuSO}_4 > \text{Glifosato} > \text{CuSO}_4/\text{Gli} > \text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, y sobre *A. franciscana*: $\text{Glifosato} > \text{CuSO}_4/\text{Gli} \approx \text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{Gli} > \text{CuSO}_4 > \text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$.

Palabras clave: toxicidad aguda, oxiclورو de cobre, *Artemia franciscana*, *Scenedesmus intermedius*, *Vibrio fischeri*.

ABSTRACT

This thesis integrates the results of research on the use of copper-based inorganic pesticides; copper oxychloride [Cu₂(OH)₃Cl], copper sulfate (CuSO₄) and their mixture with glyphosate (C₃H₈NO₅P), examining the damage on aquatic ecosystems in terms of acute toxicity through toxicity indices, such as median lethal concentration (LC₅₀), median inhibitory concentration (IC₅₀) and median effective concentration (EC₅₀), through bioassays with bioindicators of the first trophic level: microcrustacean *Artemia franciscana*, green microalgae *Scenedesmus intermedius* and marine bacteria *Vibrio fischeri*. The results obtained from the acute exposure with Cu₂(OH)₃Cl on *A. franciscana* show a LC₅₀₍₂₄₎ of 76.21 mg L⁻¹ which, according to the classification of the United States Environmental Protection Agency (US-EPA), was of category III, determining it as a hazardous substance for the aquatic environment, as well as on the *S. intermedius* algae with an IC_{50(7d)} of 40.86 mg L⁻¹. In addition, a comparative analysis was performed using another commonly used fungicide-algaecide, CuSO₄, which in its response on *A. franciscana*, obtained a LC₅₀₍₂₄₎ of 34.04 mg L⁻¹, belonging as same to category III of hazardous substances for aquatic organisms, however, on *S. intermedius* algae it reached an IC_{50(7d)} of 2.86 mg L⁻¹, which classifies it in category II as a substance toxic to the aquatic environment by the US-EPA.

In the case of C₃H₈NO₅P, the result was of greater toxicity on the bioindicator *A. franciscana*, where a LC₅₀₍₂₄₎ of 0.31 mg L⁻¹ was obtained, which classifies it in category I of the US-EPA as a very toxic substance for the aquatic environment, although on the *S. intermedius* algae the result obtained from the IC_{50(7d)} of 4.28 mg L⁻¹ includes it within category II as a toxic substance for the aquatic environment, as was the case with CuSO₄.

Finally, the study of the decrease in bioluminescence in the marine bacteria *V. fischeri*, with an EC₅₀ of 12.68 mg L⁻¹, shows that it was the most sensitive to Cu₂(OH)₃Cl. The comparison of the toxicity of the pesticides individually and in mixtures was on *S. intermedius*: Cu₂(OH)₃Cl/Gly > CuSO₄ > Glyphosate > CuSO₄/Gly > Cu₂(OH)₃Cl, and on *A. franciscana*: Glyphosate > CuSO₄/Gly ≈ Cu₂(OH)₃Cl/Gly > CuSO₄ > Cu₂(OH)₃Cl.

Key words: acute toxicity, copper oxychloride, *Artemia franciscana*, *Scenedesmus intermedius*, *Vibrio fischeri*.

INTRODUCCIÓN

La contaminación se caracteriza por la introducción o incremento de sustancias que pueden causar daño sobre la salud humana, perjudicar los recursos vivos y los sistemas ecológicos; la contaminación está relacionada frecuentemente con la actividad del hombre (Alloway & Ayres, 1997; Bautista, 1999). Los plaguicidas han brindado grandes beneficios a la producción de los cultivos, pero es importante resaltar que solamente una parte de lo que se aplica ejerce su función, el resto es distribuido en el ambiente. La presencia de estas especies en agua subterráneas, cuerpos de aguas naturales como ríos, unidos a las descargas en lados o mares, es un tema que preocupa desde varios puntos de vista: desde la salud, lo ecológico, lo ambiental y lo productivo. Los principales contaminantes de estos ambientes acuáticos son detergentes, insecticidas, grasas, colorantes, disolventes, metales, plaguicidas, sales inorgánicas, fertilizantes y descargas de residuos sólidos (Solís & López, 2003). En nuestro país, el control de arvenses es casi exclusivamente químico y entre los agroquímicos más utilizados se encuentran los basados en cobre y el glifosato.

El abuso en el uso de biocidas en particular provoca una interacción negativa con el ecosistema donde se están aplicando. Algunos plaguicidas según su estructura y características fisicoquímicas persisten en el ambiente, propiciando con ello la acumulación en agua y suelo principalmente, subiendo después por la cadena trófica y llegando hasta los seres humanos a través de fenómenos de biomagnificación (Jaramillo *et al.*, 2009).

Un buen conocimiento de la toxicidad de las sustancias sólo puede obtenerse por estudios retrospectivos de casos de intoxicación o por ensayos experimentales con animales y plantas mejor conocidos como bioensayos (Repetto, 1988).

En los bioensayos de toxicidad aguda la mejor información sobre las relaciones concentración y respuesta de los compuestos químicos en el medio es sin lugar a duda la CL₅₀ (Concentración Letal media) y CI₅₀ (Concentración Inhibitoria media), expresando los efectos letales e inhibitorios a corto plazo. Puesto que hay muchas dificultades en el mantenimiento y cultivo de organismos, la mayoría de los ensayos se realizan con un número limitado de especies las cuales son fáciles de mantener, de manipular y de cultivar en el laboratorio (Bayne, 1986).

En la actualidad existe una necesidad de contar con información toxicológica de todos los agroquímicos utilizados. En nuestro país, el control de arvenses es casi exclusivamente químico y entre los agroquímicos más utilizados se encuentran los basados en cobre y el glifosato. Según la COFEPRIS (2016), uno de los fungicidas más usados en el mundo es el oxiclорuro de cobre, razón por la cual en este trabajo se propone su evaluación individual y en mezcla con el glifosato y también una comparativa con el sulfato de cobre, otro importante plaguicida basado en cobre, todo ello a través de un bioensayo de toxicidad aguda sobre dos bioindicadores, uno perteneciente al zooplancton: *Artemia franciscana*; otro perteneciente al fitoplancton: *Scenedesmus intermedius* y también a través de la bacteria marina *Vibrio fischeri*. Por un lado, *Artemia franciscana* se caracteriza por ser un consumidor primario incluido en el zooplancton del ambiente marino que además tiene las ventajas de ser cosmopolita, fácil de cultivar en el laboratorio y tener poblaciones similares en tamaño y fisiología debido a la eclosión simultánea de quistes (Papadopoulos *et al.*, 2004). Por otra parte, *Scenedesmus intermedius* se trata de un productor primario de amplia distribución y su importancia como bioindicador radica en que el fitoplancton responde rápidamente a los cambios ambientales por su ciclo de vida corto (Vázquez *et al.*, 2006). Por último, la bacteria marina *Vibrio fischeri* es un excelente bioindicador de sustancias tóxicas ya que permite, a través de cambios en su metabolismo, la medición de las variaciones en su bioluminiscencia cuando interactúa con un xenobiótico.

La información toxicológica que existe sobre el efecto tóxico combinado de productos químicos es aún muy reducida y los fenómenos de aditividad, potenciación, sinergismo y antagonismo se incrementan al aumentar la cantidad de sustancias presentes en la mezcla, lo que destaca la importancia de considerar la acción conjunta de contaminantes en la estimación del efecto tóxico que estos producen en los sistemas naturales. Cuando las mezclas se componen de sustancias químicas con distintos modos de acción, existen pruebas fehacientes de que sus efectos son mayores que los de cada componente por separado (Feron *et al.*, 2002; Finizio *et al.*, 2005).

Los márgenes de seguridad utilizados actualmente en la evaluación de riesgos de sustancias químicas individuales podrían ser insuficientes para dar cabida a los efectos de todas las mezclas razonablemente posibles.

Por ello, en este estudio, no solo se ha querido valorar la toxicidad aguda individual en el ecosistema acuático de los agroquímicos basados en cobre (oxicloruro de cobre y sulfato de cobre), sino también determinar si su respuesta varía al estar presente un herbicida tan utilizado junto a ellos como es el glifosato, ya que el enfoque clásico, que examina cada sustancia química por separado, podría conducir a una subestimación de los riesgos.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓTICO

MARCO TEÓRICO

CONTAMINACIÓN

El deterioro de los ecosistemas debido a la contaminación es un problema crítico de nuestros tiempos. A medida que aumenta el poder de la humanidad sobre la naturaleza y aparecen nuevas necesidades como consecuencia de la vida en sociedad, el medio ambiente que la rodea se deteriora cada vez más. Por una parte, el progreso tecnológico y, por otra parte, el acelerado crecimiento demográfico, sumado con la demanda actual de alimentos y la generación de desechos en las etapas de producción, distribución y consumo, producen la alteración del medio, llegando en algunos casos a atentar contra el equilibrio biológico de la Tierra. No es que exista una incompatibilidad absoluta entre el desarrollo tecnológico, el avance de la civilización y el mantenimiento del equilibrio ecológico, pero es importante que la humanidad sepa armonizarlos para que no aumente la frecuencia y la gravedad de los incidentes de contaminación a nivel global ni los efectos adversos sobre la salud de los humanos y del medio ambiente (Suárez & González, 2014).

La contaminación está dada por dos causas principales, la primera conocida como contaminación natural, que es aquella producida por la naturaleza y no supone un riesgo por sí sola, y la contaminación antropogénica, es decir, la causada por humanos (Figura 1). Esta última, se caracteriza por la introducción de desechos y sustancias al medio ambiente, sus principales consecuencias son: daño al ser humano, los seres vivos y los ecosistemas (Alloway & Ayres, 1997; Bautista, 1999). La contaminación puede ser clasificada de acuerdo con el lugar donde se presenta, por ejemplo: contaminación del suelo, del aire y del agua.

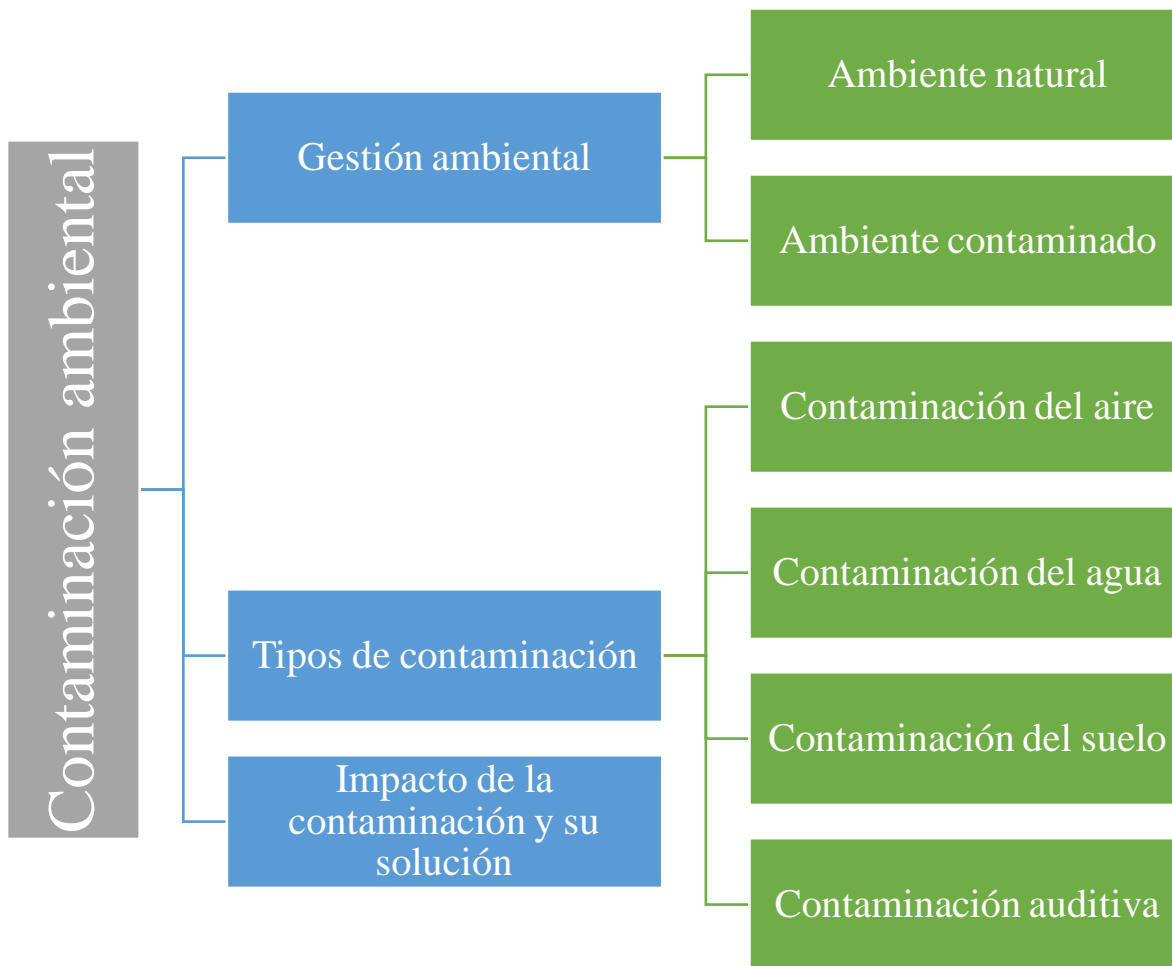


Figura 1. Macroestructura de contaminación ambiental. Tomado de Pursitasari *et al.*, 2019.

Como protección del medio ambiente hay que entender la preservación de las aguas, del suelo y del aire, así como de los seres vivos que en ellos habitan, frente a los posibles daños producidos por la generación de residuos (Riva, 1991).

La contaminación del aire se produce por la presencia en la atmósfera de gases, partículas y vapores que han sido incorporados directa o indirectamente al aire por el ser humano o por fuentes naturales en cantidades suficientes como para afectar negativamente animales, vegetación, materiales y al ser humano mismo. Los gases contaminantes más comunes son el monóxido de carbono, el dióxido de azufre, los clorofluorocarbonos y los óxidos de nitrógeno producidos por la industria y por los gases producidos en la combustión de los vehículos (Alfaro, 1999).

La contaminación del suelo se da por la incorporación de elementos extraños en el suelo, de tal forma que estos generen un efecto nocivo para los organismos presentes en él y sus consumidores. Entre los contaminantes del suelo más significativos se encuentran los hidrocarburos como el petróleo y sus derivados, los metales pesados frecuentes en baterías, los herbicidas y plaguicidas generalmente rociados a los cultivos industriales y monocultivos y organoclorados producidos por la industria. Esta contaminación puede afectar a la salud de forma directa y al entrar en contacto con fuentes de agua potable (San Juan, 2010).

La contaminación del agua procede de la adición de materia extraña indeseable que deteriora su calidad y se da por la liberación de residuos y contaminantes que drenan a las escorrentías y luego son transportados hacia ríos, penetrando en aguas subterráneas o descargando en lagos o mares. Los principales contaminantes son detergentes, insecticidas, grasas, colorantes, disolventes, metales, plaguicidas, sales inorgánicas, fertilizantes y descargas de residuos sólidos (Solís & López, 2003). Los sistemas acuáticos son receptores de toda clase de desechos urbanos que, en su mayoría, son orgánicos; detectándose, además, la presencia de compuestos tóxicos (Fargašová, 2001), que generalmente son considerados agresivos por su persistencia en los sedimentos (Visviki & Rachlin, 1991). Un aumento en los niveles de contaminantes (metales y compuestos orgánicos persistentes o COP's) en los sistemas acuáticos, es un hecho que constituye un riesgo para actividades como las pesquerías y el cultivo de organismos (acuicultura); implican un peligro a la salud pública de los habitantes de éstas áreas; y una de las principales medidas para la conservación del ecosistema pasa por evaluar los efectos sobre la biota que los habita y desarrollar normas de gestión adecuadas en base a los niveles guía determinados en campo y laboratorio (Baudouin & Scoppa, 1974).

La industria química en general y concretamente la industria textil ha comenzado desde hace tiempo a sensibilizarse de manera que, junto a los aspectos puramente técnicos y económicos, van adquiriendo mayor significado los puntos de vista ecológicos (Rosenthal, 1990). Empresas productoras, fabricantes y consumidores se enfrentan a los riesgos de los productos tanto para el hombre como para el medio ambiente. Las empresas de productos químicos editan las hojas de datos de seguridad del producto, uno de cuyos fines

fundamentales es transmitir los conocimientos de los datos ecotoxicológicos, indispensables en cuanto a precauciones de manipulación y vertido de residuos (Riva, 1991).

CONTAMINACIÓN DEL AGUA

El origen del agua se atribuye a dos teorías: origen volcánico y origen meteórico. Su existencia es tan antigua como la formación de la superficie terrestre (hace aproximadamente 3.8 billones de años), y representa la sustancia esencial que dio origen a la vida (Fontúrbel, 2004). Es importante dimensionar la cantidad de agua realmente disponible para su uso. La superficie del planeta se compone de 75 % de agua y 25 % de tierra, donde solo el 3 % del agua se puede usar para consumo humano. Este 3 % se encuentra en el ambiente en diferentes estados de agregación del cual 90 % está en los glaciares y lo restante se encuentra en ríos, pozos o nubes. De acuerdo con lo anterior, la cantidad de agua que se dispone para satisfacer las necesidades humanas es verdaderamente limitada (Chapman, 1996). El agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida y sostén del medio ambiente que, como consecuencia del rápido desarrollo humano y económico y su uso inadecuado como medio de eliminación de desechos, ha sufrido un alarmante deterioro. Durante décadas, toneladas de sustancias biológicamente activas, sintetizadas para su uso en la agricultura, la industria, la medicina y otras áreas, han sido vertidas al medio ambiente sin tomar en consideración las consecuencias de estos actos. Las sustancias contaminantes y especies tóxicas generadas impactan desfavorablemente la resiliencia del ecosistema. Al problema de contaminación que comenzó a hacerse notable a principios del siglo XIX, se añade el problema de la escasez que está adquiriendo proporciones alarmantes a causa del cambio climático y la creciente desertización que está sufriendo el planeta (Barceló & López, 2007).

Las medidas legislativas que se han ido adoptando progresivamente para evitar la contaminación química del agua y los riesgos que se derivan de ella han contribuido a paliar parcialmente esta situación. Sin embargo, la creciente demanda de agua y el descubrimiento continuo de nuevos contaminantes potencialmente peligrosos dejan clara la necesidad de seguir investigando en todas aquellas áreas que puedan contribuir a proteger la salud humana y la del medio ambiente, conseguir un uso sostenible del agua y atenuar los efectos de las sequías y el cambio climático (Pizzolato *et al.*, 2014).

La aparición de elementos "no deseables" y tóxicos, y la variación en las concentraciones de los constituyentes comunes, tiene su origen en el denominado "ciclo del agua" (Figura 2). En alguna parte de este ciclo, en el cual confluyen distintos compartimentos ambientales y actividades humanas, es donde se produce la contaminación del agua o, mejor dicho, la alteración de su calidad. De acuerdo con este ciclo, las principales vías de entrada de contaminantes en el medio ambiente acuático son las aguas residuales, entre las que se incluyen las urbanas, industriales, y las de origen agrícola o ganadero. La prevalencia de una u otra depende en gran medida del tipo de contaminación de que se trate y del nivel de depuración o atenuación natural (si existe) que experimentan (Barceló y López, 2007).

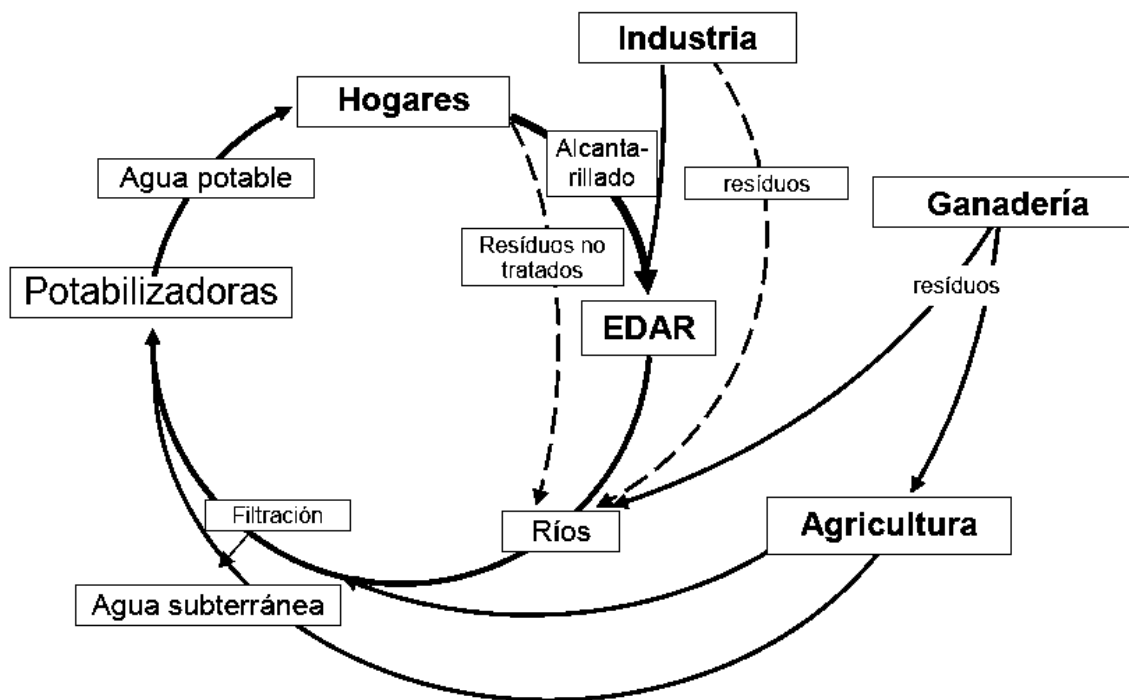


Figura 2. Ciclo del agua. Tomado de Barceló & López, 2007.

Los efectos de la contaminación química del agua son múltiples; entre los más importantes están:

- Acción tóxica y cancerígena.
- Incidencia sobre la producción de alimentos.

- Limitación del uso del agua con fines recreativos.
- Reducción de las posibilidades de su uso industrial y agropecuario.

Los riesgos que siguen a la contaminación del agua son difíciles de precisar, ya que muchas veces las dosis tóxicas sobre las cuales se trabaja son muy pequeñas, y el problema se complica más debido a la presencia simultánea de diversos contaminantes (Jones *et al.*, 2001).

La calidad del agua es tan importante como su cantidad (Tabla 1). Aunque una vez utilizada la mayoría del agua retorna a sus causas originales, inevitablemente, su calidad se degrada (Spiro & Stigliani, 2004).

Tabla 1. Efecto de los usos del agua sobre su calidad. Tomado de Spiro & Stigliani, 2004.

Usos del agua	Efectos sobre la calidad del agua
Doméstico/industrial	Disminución del oxígeno disuelto.
Industria/minería	Disminución del oxígeno disuelto; contaminación del agua con metales y compuestos orgánicos; drenaje ácido de minas.
Termoeléctrico	Incremento de la temperatura del agua.
Irrigación/residuos animales	Salinización del agua superficial y agua subterránea, disminución del oxígeno disuelto.

En la actualidad el problema más serio procede de las fuentes no puntuales. Éstas incluyen emisiones procedentes de vehículos, escorrentía agrícola, que vierte una elevada cantidad de nutrientes y arcillas a las corrientes de agua y agua subterráneas y escorrentía urbano que descarga, mediante arrastre por el agua de lluvia, compuestos orgánicos y metales a las plantas de tratamiento, ríos y lagos (Figura 3) (Spiro y Stigliani, 2004).

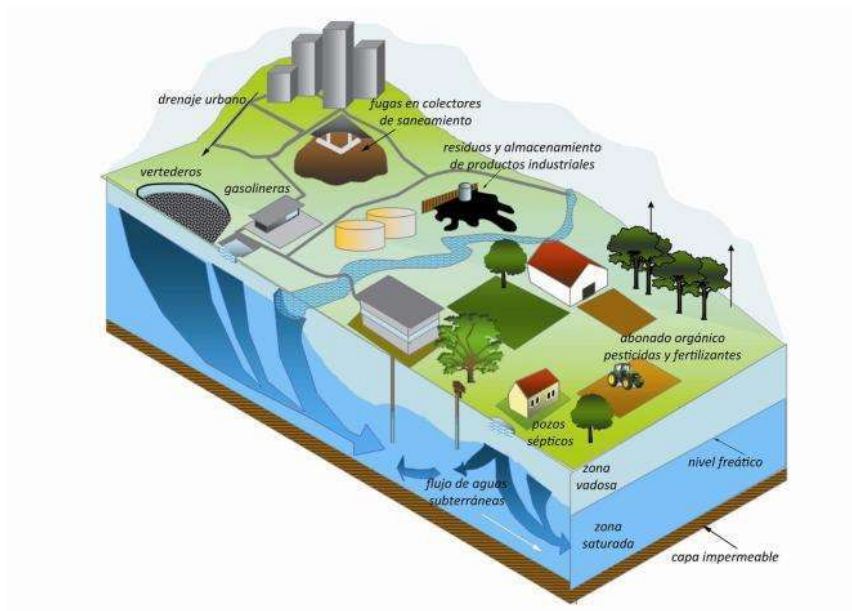


Figura 3. Fuentes de contaminación no puntuales. Tomado de WordPress.

La situación de la contaminación marina en zonas costeras ha sido particularmente difícil de documentar y concentrar. Los cambios a largo plazo producto de los impactos crónicos en los ambientes marino-costeros están dirigidos a:

- Pérdida de la diversidad biológica global.
- Disminución de la abundancia de especies importantes o explotables comercialmente.
- Desestabilización de las comunidades naturales que aumentan el potencial de enfermedades, el florecimiento de algas tóxicas y la introducción de especies exóticas.
- Pérdida de ecosistemas o ecotonos que sirven de sostén al equilibrio ecológico.

La magnitud de la degradación costera (p. ej., en la Región del Gran Caribe) es amplia y hoy en día constituye una amenaza a la salud humana a medida que los procesos de eutrofización cultural promueven tanto la proliferación de algas productoras de toxinas, como de patógenos. Más allá del daño ecológico y la amenaza a la salud humana, hay una pérdida seria de la calidad de vida de los habitantes (UNEP, 2000).

PLAGUICIDAS

El uso de plaguicidas modernos en la agricultura y en la salud pública, se remonta al siglo XIX. La primera generación de plaguicidas estuvo constituida por compuestos altamente tóxicos, tales como arseniato de calcio $[\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2]$, arseniato de plomo (AsHO_4Pb), cianuro de hidrógeno (HCN), caldo bordelés (Figura 4) y azufre (S), usados a partir de 1860, para controlar hongos, insectos y bacterias. Debido a su elevada toxicidad dejaron de aplicarse, y fueron reemplazados por plaguicidas de segunda generación, los compuestos orgánicos sintéticos (Zacharia, 2011). Ante el exponencial crecimiento demográfico, se acrecentó la demanda de alimentos y, los agricultores, para satisfacerla han tenido que tomar medidas con el fin de aumentar la calidad y cantidad de las cosechas, así como para disminuir los efectos adversos provocados por el clima o las plagas que merman la producción de los productos del campo (Solís-González *et al*, 2019).



Figura 4. Caldo bordelés preparado a partir de CuSO_4 , cal hidratada y agua.

La FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) define a plaguicida como “una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedad humana o animal, especies indeseadas de plantas o animales capaces de causar daños o interferir de cualquier otra forma con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o mercado de los alimentos, otros productos agrícolas, madera y sus derivados o alimentos animales, o que pueden ser administrados a los animales para el control de insectos, arácnidos u otras plagas en sus organismos” (FAO, 1989; WHO, 1990) (Figura 5). Estas sustancias se pueden clasificar según su toxicidad, su naturaleza química o su función.

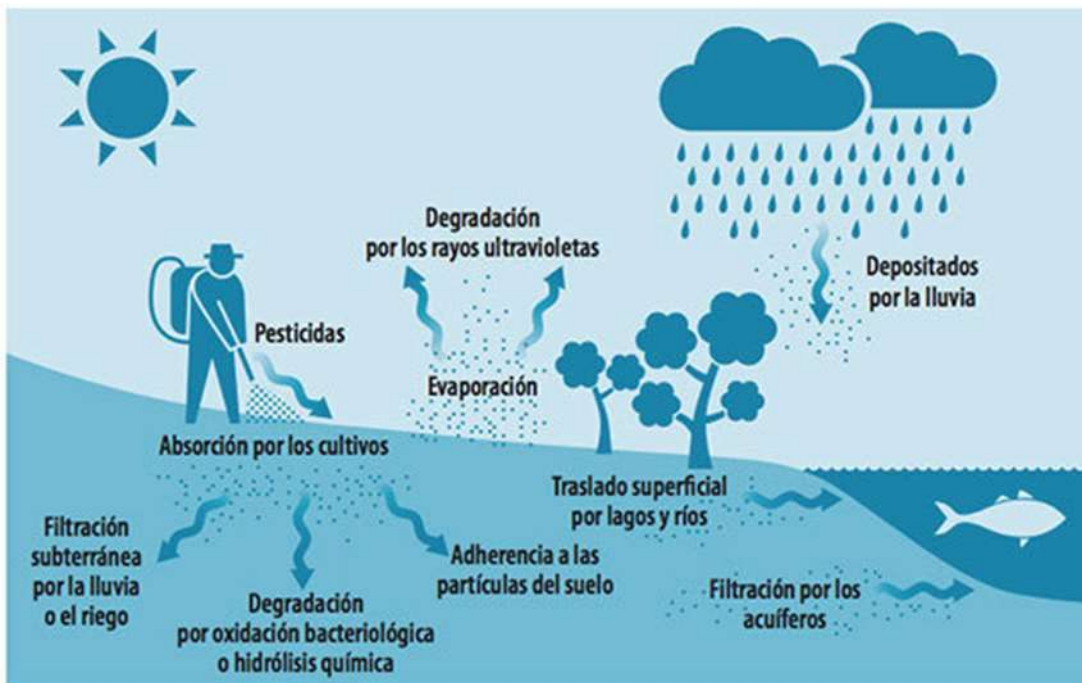


Figura 5. Ciclo de los plaguicidas en el medio ambiente. Tomado de Nueva tribuna (2020).

Clasificación según toxicidad: para su clasificación se tiene en cuenta la concentración letal 50 (CL_{50}), la cual se define como la cantidad de una sustancia que al ser suministrada a bioindicadores de experimentación mata al 50% de esa población (Eddleston *et al.*, 2005). En Estados Unidos, la EPA (Environmental Protection Agency) realizó una categorización de las sustancias tóxicas para el ambiente acuático de acuerdo con la concentración del tóxico necesaria para matar a la mitad de la población de ensayo (Tabla 2).

Tabla 2. Categorización de las sustancias de acuerdo con la toxicidad aguda expresada en $mg L^{-1}$. Tomado de EPA, 1996.

Toxicidad aguda ($mg L^{-1}$)	Categoría
≤ 1	I: Sustancias muy tóxicas para el ambiente acuático.
1 – 10	II: Sustancias tóxicas para el ambiente acuático.

10 – 100	III: Sustancias peligrosas para el ambiente acuático.
≥ 100	IV: Sustancias consideradas no tóxicas.

Clasificación según su naturaleza química: la clasificación de los plaguicidas según su origen químico y sus características están en la Tabla 3 y pueden ser de origen natural, hasta totalmente sintéticos.

Tabla 3. Clasificación de plaguicidas según su naturaleza química.

Tipo	Características
Inorgánicos	Fabricados a partir de metales como Cu, Pb, Ar, etcétera.
Vegetales	Extraídos de diversas partes vegetales, como las piretrinas.
Organosintéticos	Sintetizados por los humanos en el laboratorio (organoclorados, organofosforados, carbamatos).
Microorganismos vivos	Virus, bacterias y hongos utilizados en el control biológico de plagas.

Clasificación según su función: pueden ser insecticidas, fungicidas, herbicidas y rodenticidas (FAO, 1986).

Insecticidas:

- Organoclorados: endrín, aldrín, DDT, lindano, toxafeno.
- Organofosforados: paratión, clorpirifos, diazinon, diclorvos, malation, dimetoato.
- Carbamatos: aldicarb, carbofuran, propoxur, carbaril.
- Piretrinas y piretroides: resmetrina, bioresmetrina, aletrina, decametrina, permetrina.
- Otros: ivermectina.

Fungicidas:

- Sales de cobre: oxiclورو de cobre y sulfato de cobre.
- Derivados de la ftalimida: captafol.

- Dinitrofenoles: dinitro-orto-cresol.
- Dithiocarbamatos: maneb, zineb, mancozeb.

Herbidas:

- Bipiridilos: paraquat, Diquat.
- Glifosato.

Rodenticidas:

- Inorgánicos: sulfato de talio, anhídrido arsenioso, fosfuro de aluminio, fosfuro de zinc.
- Orgánicos: anticoagulantes: cumarinas (Warfarina).

Los pesticidas químicos han sido de gran ayuda para las naciones en vías de desarrollo en sus esfuerzos por erradicar las enfermedades endémicas transmitidas por insectos, producir alimentos adecuados y proteger los bosques, las plantaciones y las fibras (madera, algodón, ropa, etc.), con su consecuente incremento en la productividad agrícola global (Ecobichon, 2001). Los plaguicidas son el único grupo de sustancias químicas que se aplican deliberadamente en el medio ambiente, con el objeto de controlar plagas en plantas, animales y lugares en donde se almacenan alimentos. Sin embargo, la mayoría de los plaguicidas no actúan de manera específica sobre la plaga objetivo, ya que afectan simultáneamente a especies no objetivo, alterando el balance ecológico (Pesticide Action Network, 2010). En general los pesticidas son más valuados en países en desarrollo, particularmente aquellos en regiones tropicales, que buscan ingresar a la economía global proveyendo de frutas y vegetales fuera de temporada a aquellos países con climas más fríos. Tales naciones en desarrollo se están convirtiendo en importantes “graneros” para el mundo, siendo capaces de producir dos o incluso tres cosechas por año. Sin embargo, estos objetivos no pueden ser alcanzados sin incrementar el uso de pesticidas, principalmente insecticidas, herbicidas y fungicidas, agentes que no se utilizan tan ampliamente en las prácticas agrícolas tradicionales (Forget *et al.*, 1993; Ecobichon, 2001).

El uso indiscriminado y a veces fraudulento de herbicidas y de sustancias reguladas en países subdesarrollados, que inclusive están prohibidos en algunos países desarrollados (p. ej. Unión Europea y Estados Unidos), ha causado un efecto negativo en plantas, suelo y aguas subterráneas en el área donde esas sustancias son aplicadas. Algunos plaguicidas, según su estructura y características fisicoquímicas, persisten en el ambiente, propiciando con ello la acumulación en agua y suelo principalmente, integrándose en la cadena trófica hasta llegar a los seres humanos (WHO, 1994; Jaramillo *et al.*, 2009) (Figura 6 y Figura 7). La contaminación ambiental también está presente en la población humana a través de la absorción de plaguicidas por inhalación durante su aplicación y consumo a través de los alimentos.



TOXICOS EN LA CADENA TROFICA:

Cómo se concentran en los organismos?



- ☀ Bioacumulación
- Bioconcentración
- Biomagnificación

Figura 6. Tóxicos en la cadena trófica y principales formas de concentración en los organismos.

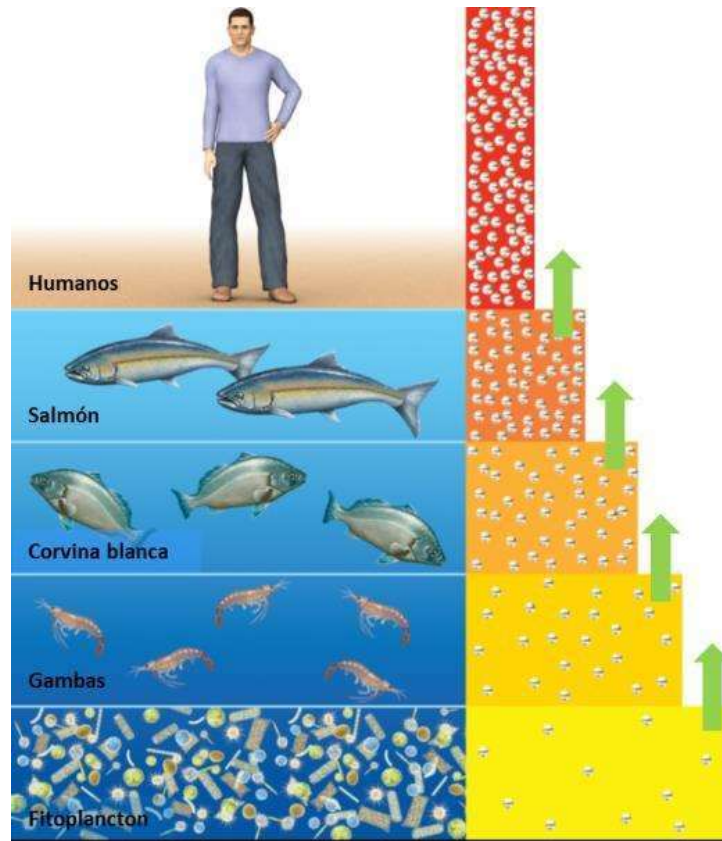


Figura 7. Cadena trófica marina y concentración de sustancias tóxicas hasta el humano.

EL USO DE PLAGUICIDAS EN MÉXICO

En el Catálogo de Plaguicidas de 2016, en México se encuentran 282 empresas que cuentan con un total de 3140 registros sanitarios vigentes de ingredientes activos incluidos en la lista de plaguicidas altamente peligrosos de PAN Internacional (Red de Acción de Plaguicidas, por sus siglas en inglés) y autorizados por COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios). Esto incluye a todos los tipos de plaguicidas (insecticidas, herbicidas, fungicidas etc.), y para todos los usos: agrícola, forestal, pecuario, doméstico, jardinería, urbano e industrial (Bejarano *et al.*, 2017). El que estén registrados tal cantidad de plaguicidas por estas empresas no significa que actualmente se encuentren a la venta, puede que hayan sido retiradas por éstas sin previo aviso, lo que sí indica ese número es la cantidad de fórmulas y productos a los que han sido expuestos la población y el ambiente.

Hay un alto grado de concentración de los registros de los plaguicidas altamente peligrosos por unas decenas de empresas, lo que refleja la concentración del mercado de plaguicidas. Del total de 282 empresas, las primeras 12 concentran la tercera parte (33.28%) del total de los registros autorizados de plaguicidas altamente peligrosos y 30 de ellas un poco más de la mitad (54.94%) con 1,726 registros autorizados.

Los ingredientes activos de los plaguicidas que tienen un mayor número de registros no significan necesariamente que sean los usados en mayor volumen, aunque sí lo podemos considerar como un indicador de su demanda y del interés comercial para su formulación y venta. En México no se cuenta con información accesible al público sobre el nombre, tipo y cantidad de cada plaguicida autorizado que se aplica a nivel nacional (Bejarano *et al.*, 2017).

La contaminación de los ecosistemas acuáticos por plaguicidas ha sido bien documentada en todo el mundo y constituye un problema importante que suscita preocupaciones a nivel local, escalas regionales, nacionales y globales (Huber *et al.*, 2000; Cerejeira *et al.*, 2003). En el mundo se utilizan más de 1000 plaguicidas para evitar que las plagas estropeen o destruyan los alimentos. Cada plaguicida tiene propiedades y efectos toxicológicos distintos. Los instrumentos internacionales como el Convenio de Róterdam, que limita el comercio de plaguicidas muy peligrosos y el código de conducta de la FAO sobre plaguicidas, alientan cada vez más a las autoridades nacionales de reglamentación a reexaminar la gama de plaguicidas que autorizan en el país (del Puerto *et al.*, 2014); aunque en países como México no se cuenta con datos oficiales de las cantidades de plaguicidas utilizados, excepto con el Consumo Aparente de Plaguicidas (CAP), el cual se calcula normalmente como la producción más la importación menos la exportación, donde, hasta 2007 (último año que presenta este dato), el CAP fue de 50,270 toneladas (Tabla 4) (INEGI, 2016). Sin embargo, según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT FAO), en 2018 en México se utilizaron 53,144 toneladas, ocupando el 11.º lugar mundial en el consumo de plaguicidas de las 4,122,334 toneladas utilizadas mundialmente en ese mismo año.

Tabla 4. Consumo aparente de plaguicidas en México a partir de la producción más la importación menos la exportación en miles de toneladas. Tomado de INEGI, 2016.

CONSUMO APARENTE DE PLAGUICIDAS				
(miles de toneladas)				
AÑO	PRODUCCIÓN	IMPORTACIÓN	EXPORTACIÓN	CONSUMO APARENTE
1994	9.80	32.70	4.80	37.70
1995	12.10	28.40	8.60	31.90
1996	14.20	39.80	9.90	44.10
1997	17.10	45.00	11.80	50.30
1998	17.30	47.70	12.70	52.30
1999	22.90	48.90	13.00	58.80
2000	20.40	45.50	13.80	52.10
2001	23.80	69.50	14.50	78.80
2002	23.52	52.42	15.61	60.33
2003	20.31	54.17	21.52	52.95
2004	23.93	61.99	16.69	69.24
2005	30.49	69.92	12.94	87.47
2006	26.45	17.63	2.31	41.77
2007	27.20	25.36	2.29	50.27
2008	32.58	ND	ND	ND
2009	32.02	ND	ND	ND
2010	31.88	ND	ND	ND
2011	34.74	ND	ND	ND
2012	37.68	ND	ND	ND
2013	31.20	ND	ND	ND
2014	26.39	ND	ND	ND
2015	26.91	ND	ND	ND

FUNGICIDAS CÚPRICOS

Los fungicidas cúpricos actúan por contacto y de forma preventiva (Figura 8), formando una barrera protectora en la superficie de las hojas contra el ataque de hongos endoparásitos. Los iones son absorbidos por las esporas del hongo y las bacterias hasta que la acumulación resulta letal para sus células. El Cobre (II) ejerce una acción múltiple en las células de los hongos: bloque del proceso respiratorio, inhibición de la síntesis de proteínas y reducción de la actividad de la membrana celular. Esta acción multisitio se ejerce en distintos procesos controlados por distintos genes, de tal modo que la aparición del fenómeno de la resistencia será muy improbable (Latorre, 1989). Entre los fungicidas de contacto, los cúpricos tienen la ventaja de tener una buena tenacidad (Fernández, 2001), manifiesta que su mecanismo de acción recae en los esporangios y las zoosporas, donde desnaturalizan enzimas de la cadena respiratoria. Si a esta ventaja se le añade el amplio espectro que poseen estos compuestos cúpricos, actuando de forma preventiva y curativa sobre diversas enfermedades causadas por hongos, no es extraño que estos compuestos a base de cobre tengan una alta demanda en el mercado de los plaguicidas.

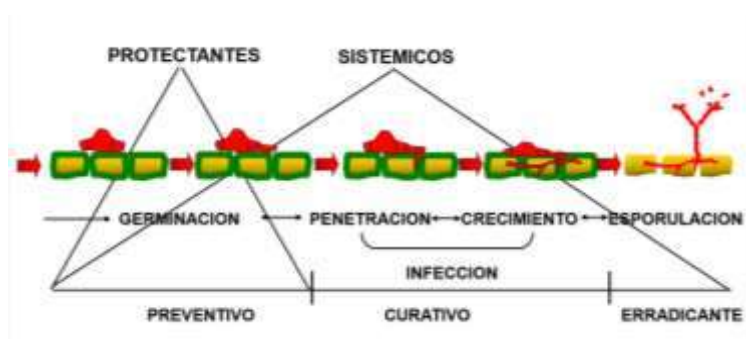


Figura 8. Modo de acción de los fungicidas. Tomado de Bayer, 2022.

OXICLORURO DE COBRE

En 1880, llegó a Europa procedente de América el mildiu de la vid (Figura 9). Una enfermedad que causó daños devastadores en todos los viñedos de Francia. Por aquel entonces solo existían los compuestos azufrados para tratar las plagas causadas por hongos. Sin embargo, por accidente Millardet se dio cuenta de que en que ciertas cepas embadurnadas con una mezcla de CuSO_4 y cal, distinguibles por su tonalidad azulada, no contraían la enfermedad. A partir de esta combinación el profesor desarrolló la fórmula del que fue el

primer compuesto de síntesis química, el sulfato cuprocálcico $[\text{CuSO}_4 \cdot 3\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot 3\text{CaSO}_4]$ o también llamado caldo bordelés. Desde entonces, se fomentó la investigación de los compuestos derivados del cobre para atacar las enfermedades causadas por hongos.



Figura 9. Mildiu de la vid. Tomado de Viver-vid (2022).

El oxiclорuro de cobre $[\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}]$ es un fungicida y bactericida de acción preventiva, con un buen campo de actividad y buena persistencia. Los fungicidas cúpricos pueden considerarse como compuestos insolubles que, en contacto con el agua, liberan pequeñas cantidades de iones Cu^{+2} en el orden de ppm (Ossana, 2011), se caracteriza por ser una solución verdosa-azulada preparada anteriormente de su aplicación sobre las siembras (Figura 10).



Figura 10. Preparación artesanal de $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ y su aplicación en huertas de aguacate de Michoacán.

El $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ es un fungicida no sistémico o de contacto de acción preventiva. Este tiene la ventaja de tener una buena tenacidad y la desventaja de tender a retrasar el desarrollo vegetativo de la planta por lo que se recomienda su utilización después de empezada la floración. Su acción fungicida es en los esporangios y las zoosporas en las que desnaturalizan enzimas de la cadena respiratoria (Figura 11) (Schwinn & Margot, 1991). El cobre contenido en el compuesto puede ser acumulado en suelos y aguas por lo que puede ser tóxico para muchas especies de invertebrados marinos, de agua dulce y terrestres (Gladstone, 2002).



Figura 11. Ciclo del mildiu y partes fúngicas atacadas de acuerdo con la actividad del fungicida. Tomado de BASF (2020).

SULFATO DE COBRE

El sulfato de cobre (CuSO_4) ha estado en uso desde 1838 para la conservación de la madera y hoy es la base para muchos conservantes de la madera (Schultz *et al.*, 2007). Es un compuesto de cobre de gran importancia industrial empleándose como un alguicida en la depuración del agua aprobado por la EPA (U.S.-Environmental Protection Agency) (Figura 12). El (CuSO_4) es utilizado para el control de algas, siendo parte integrante de productos comerciales de uso generalizado en acuicultura, tanto para el control de la vegetación acuática indeseable como en la inducción de la muda en los camarones y langostinos adultos (Scelzo, 1997). Así como para disminuir la proliferación de fitoplancton en aguas eutróficas (Mazon *et al.*, 2002). Como agente terapéutico, es usado masivamente como agente antiparasitario en la acuicultura, aunque no está aprobado por la FDA (U.S.-Food and Drug Administration), sin embargo, en los sistemas de producción extensiva, tales como estanques, dicha efectividad terapéutica se reduce a medida que la alcalinidad y la dureza total se incrementan (Scelzo, 1997; Velasco-Santamaría *et al.*, 2006; Chairi *et al.*, 2010). El primer uso registrado del cobre como fungicida fue 1761, pero fue hasta década de 1880 cuando el científico francés Pierre Marie Alexis Millardet descubrió las propiedades fungicidas de amplio espectro de cobre por el uso de sulfato de cobre en forma de caldo bordelés (sulfato de cobre, cal hidratada y agua) y por otra parte una mezcla de sulfato de cobre y carbonato de sodio (llamada "mezcla de Borgoña") estas mezclas se convirtieron en el fungicida de elección en Estados Unidos y Francia, respectivamente, para pulverizar las uvas y en viñedos para combatir el moho (US EPA, 2009; Borkow & Gabbay, 2009).



Figura 12. Contaminación y persistencia de CuSO_4 en un cuerpo de agua utilizado para la acuicultura tras ser desecado. Tomado de WordPress (2020).

Las propiedades fungicidas del cobre fueron demostradas en estudios controlados de laboratorio a principios de la década de 1950 y desde entonces el cobre y compuestos de cobre han demostrado ser eficaces para matar a una amplia gama de levaduras y hongos tales como *Aspergillus carbonarius* (Bellí *et al.*, 2006), *Aspergillus niger* (Mumcuoglu *et al.*, 2008), *Candida albicans* (Zatcoff *et al.*, 2008), *Cryptococcus neoformans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* (Kumbhar *et al.*, 1991). Así, los fungicidas de cobre se han vuelto indispensables y miles de toneladas se utilizan anualmente en todo el mundo en la agricultura (Weber & Rutala, 2001; La Torre *et al.*, 2007). Por ejemplo, el sulfato de cobre e hidróxido de cobre son empleadas para el control del mildiu en las uvas y el cieno verde en los estanques de granja, campos de arroz, canales de riego y drenaje, ríos, lagos, lagunas y piscinas (La Torre *et al.*, 2007).

El efecto bacteriostático de cobre se observó por el Dr. Phyllis J. Kuhn, tras estudios de laboratorio le dan el reconocimiento al comprobar que tiene potentes propiedades antibacterianas (Borkow & Gabbay, 2005). Algunos ejemplos incluyen la muerte por medio de cobre o de compuestos de cobre de *Bacillus subtilis*; *Campylobacter jejuni*; *Citrobacter*; *Clostridium difficile*; los enterococos; *Escherichia coli*; *Legionella pneumophila*; *Listeria*

monocytogenes; *Klebsiella pneumoniae*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella* sp.; *Staphylococcus aureus* (Faúndez *et al.*, 2004; Cortes *et al.*, 2006; Gant *et al.*, 2007).

Estudios recientes han demostrado que los compuestos de cobre no solubles, tales como el vidrio recubierto con finas películas de CuO (Ditta *et al.*, 2008), fosfato degradable de fibras de vidrio impregnadas con CuO (Mulligan *et al.*, 2003) o metálicos y aleaciones de cobre (Faúndez *et al.*, 2004) tienen potentes propiedades biocidas, incluso contra las esporas bacterianas (Weaver *et al.*, 2008). Es importante destacar que, a partir de la gran cantidad de ensayos de eficacia antimicrobiana patrocinado por la Asociación de Desarrollo del Cobre (CDA), la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) recientemente en el 2008, aprobó el registro de aleaciones de cobre como materiales con propiedades antimicrobianas (Copper Development Association, 2008).

Los productos de cobre son uno de los pocos plaguicidas registrados para el control de malezas acuáticas que incluyen: instalaciones de acuicultura, sistemas de drenaje (canal, zanja y lateral), estanques (agrícola, industrial y de recreación), lagos, embalses (cultivos y no de cultivos de riego, potable), lagunas de aguas residuales, la media (tanque, canal de agua y estanques) y canales de riego (US EPA, 2009).

Por último, podemos hablar sobre varios compuestos de cobre, tales como sulfato de cobre, nitrato de cobre y cloruro cúprico-bis-n-dodecilamina, que son potentes molusquicidas. Por ejemplo, se ha demostrado que los siguientes caracoles son atacados por estos compuestos: *Biomphalaria glabrata* (De Oliveira-Filho *et al.*, 2004); *Biomphalaria alexandrina* (Zidan *et al.*, 2002) y *Lymnaea natalensis*. El control de caracoles puede ser una estrategia importante en la lucha contra algunas enfermedades humanas, como la esquistosomiasis (Borkow & Gabbay, 2009).

GLIFOSATO

Carlisle & Trevors (1986), se refieren al glifosato como un herbicida sistémico no selectivo de amplio espectro que suprime el crecimiento de muchos tipos de pasto, hierbas, vides, arbustos y árboles. Estos autores comentan que su uso masivo y extendido necesita

una evaluación constante a corto, mediano y largo plazo de sus potenciales efectos nocivos sobre la salud humana y el ambiente, analizando su interacción tanto entre organismos con la posible pérdida de sus hábitats en los agroecosistemas como con otros agroquímicos.

El glifosato se usa para controlar plantas que se consideran indeseables en los cultivos, a las que comúnmente se denomina “malezas”, pero éste es un nombre erróneo pues oculta la posible contribución de diversas plantas contra la erosión del suelo, como refugio de insectos benéficos, o como fuente de hierbas comestibles, por lo que los agroecólogos prefieren llamarlas arvenses. El glifosato también se utiliza como agente desecante, en cultivos como sorgo o soya para secar el grano y adelantar la cosecha, o en caña de azúcar como madurante para aumentar el grado de sacarosa (INIFAP, 2014).

El glifosato se encuentra entre los herbicidas altamente peligrosos con mayor número de registros autorizados en México, 110 registros autorizados para uso urbano, en jardinería, para uso industrial en plantas formuladoras y uso agrícola. En este último para la destrucción de arvenses de los cultivos de maíz, frijol, trigo, cítricos, tomate, vid, sorgo y papa, entre otros. Es comercializado bajo los nombres de Aquamaster ®, Faena ®, La Fam ®, Mamba ®, Sankill ®, Glyfos ®, Roundup ® y Ramrod ® en presentaciones de concentrado soluble, gránulo soluble, líquido soluble, polvo soluble, solución concentrada y solución acuosa las cuales se expenden en concentraciones de 350 a 720 g i. a. L⁻¹ Kg⁻¹ (COFEPRIS, 2016; Bejarano *et al.*, 2017).

Según datos gubernamentales del Sistema de Información Arancelaria Vía Internet, el glifosato (sal isopropilamina de N-fosfonometil glicina) se importa desde Estados Unidos en primer lugar, seguido de la República Popular China y Taiwán, Colombia e India (SIAVI, 2014) (Figura 13). En México se puede asumir que se usaron por lo menos 13,773 toneladas de glifosato en el 2014 (Figura 14), que fue la cantidad que se importó principalmente de Estados Unidos, según datos gubernamentales (SIAVI Fracción arancelaria 2931.90.19); lo que vendría representando el 10% del total de plaguicidas usados ese año, según estimaciones (Bejarano *et al.*, 2017).

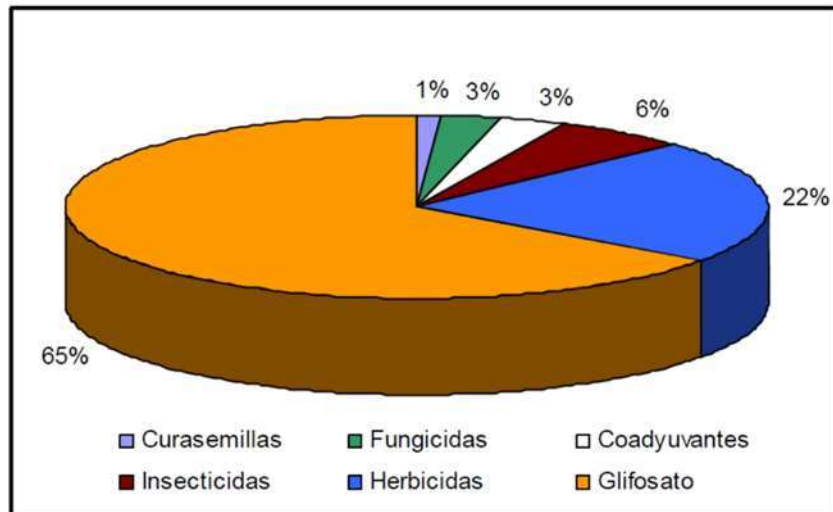


Figura 13. Distribución de plaguicidas y herbicidas importados a México.

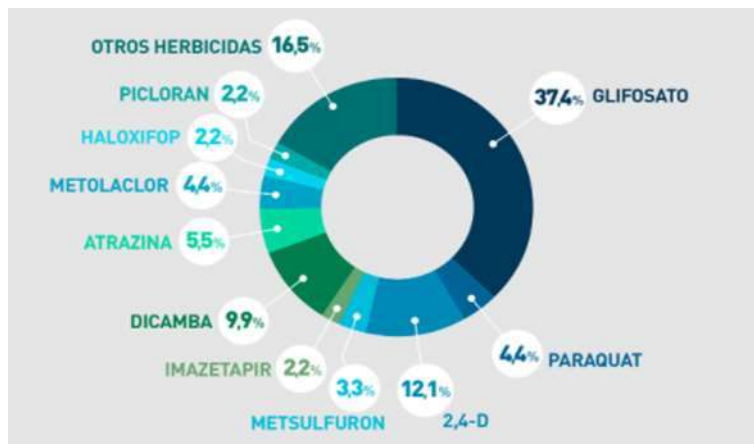


Figura 14. Principales herbicidas utilizados en el México.

El glifosato es una sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina (Figura 15) con un peso molecular de $228.18 \text{ g mol}^{-1}$, que funciona como un herbicida no selectivo, sistémico de acción foliar; el glifosato ingresa a la planta a través de las hojas y de ahí migra a otros tejidos vegetales donde es mínimamente metabolizado.

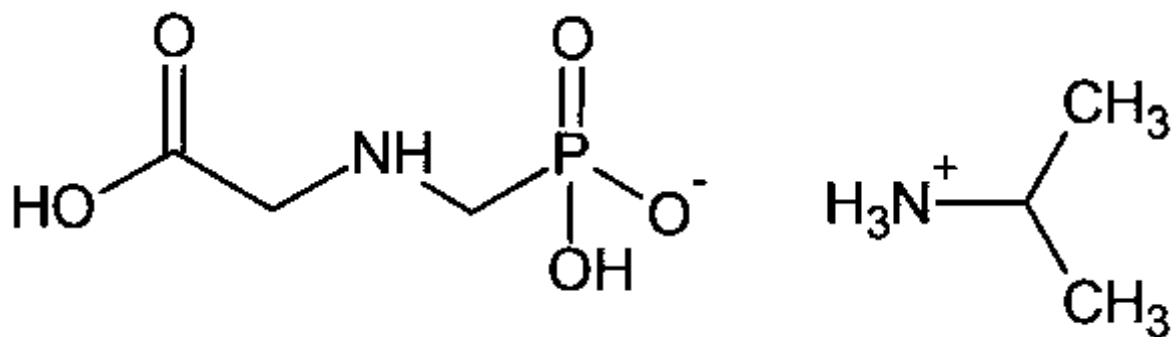


Figura 15. Sal isopropilamina de glifosato.

Debido al estado iónico del GP en el agua no se espera que se volatilice en el agua ni en el suelo (Nivia, 2001) y, dada su naturaleza altamente polar, los solventes orgánicos no pueden extraerlo de las matrices ambientales (Zavitsanos *et al.*, 2006), por lo tanto se disuelve fácilmente en el agua; Nivia (2001) realizó varios estudios para evaluar la persistencia del glifosato, el primero fue realizado en Canadá donde su persistencia fue de 12 a 60 días en aguas de estanque de tierra, sin embargo, en otro estudio realizado por la misma autora en estanques de Missouri, Michigan y Oregon, concluyó que el glifosato persiste por más tiempo en los sedimentos del fondo, donde su promedio de vida fue de 120 días a más de un año; existen, además, reportes que le atribuyen una vida media en aguas de estanque en un rango que oscila entre 70 a 84 días (NCAP, 1998; Eslava *et al.*, 2003).

El herbicida es degradado en el suelo por acción principalmente bacteriana a su metabolito el ácido aminometil-fosónico (AMPA) y dióxido de carbono (Sprankle *et al.*, 1975; Rueppel *et al.*, 1977; Mueller *et al.*, 2003). El AMPA también es tóxico y algo más móvil en el suelo, pero se descompone rápidamente, lo cual resulta en la lixiviación de cantidades mínimas en los suelos destinados a la agricultura normal (CONICET, 2009).

El mecanismo de acción del glifosato radica en la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina) mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS), con lo que se reduce la producción de proteínas y el desarrollo. El descontrol en la catálisis por la enzima EPSPS en

el penúltimo paso en la vía del shikimato, reduce también la biosíntesis de otros compuestos como el tetrahidrofolato, la ubiquinona y la vitamina K (Eslava *et al.*, 2007; COFEPRIS, 2009) (Figura 16).

Así, la inhibición de la EPSPS causa una escasez de proteínas, y consecuentemente la muerte de la planta. Como la vía del ácido shikímico no se encuentra en vertebrados, se asume que el glifosato es más seguro para mamíferos, incluyendo humanos (Williams *et al.*, 2000; Aparicio & Costa, 2013; Vera *et al.*, 2014; Mesnage *et al.*, 2015; Myers *et al.*, 2016).

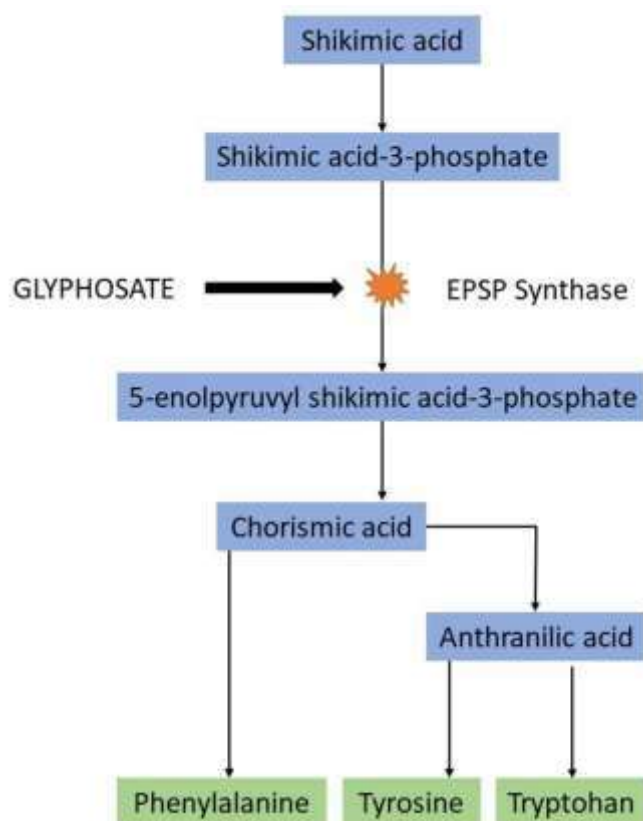


Figura 16. Inhibición de la enzima EPSPS. Tomado de Glyphosate facts (2013).

ECOTOXICOLOGÍA Y EVALUACIÓN DE RIESGO AMBIENTAL (ERA): IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS DE TOXICIDAD INDIVIDUALES Y EN MEZCLA

Duffus (1986), dentro del documento “Environmental Toxicology and Ecotoxicology”, define a la toxicología ambiental y la ecotoxicología como términos que se utilizan para describir los estudios científicos sobre los efectos adversos que ciertas sustancias pueden

tener en los organismos vivos, cuando se relacionan en el ambiente natural. Siendo la ecotoxicología un término sólo referido al estudio de los efectos químicos en los ecosistemas y sus componentes no humanos. Otra definición es la que presenta el libro “*A Textbook of Modern Toxicology*” (Hodgson, 2004), la cual plantea a la ecotoxicología como una subdivisión de la toxicología ambiental, y la cual se centra en los efectos de los contaminantes ambientales sobre los ecosistemas y los componentes de estos (que van desde los microorganismos hasta los predadores superiores).

De todos los ecosistemas, el acuático cobra una gran importancia en estos estudios toxicológicos debido a la gran variedad de químicos que se diluyen en él. Estos estudios facilitan datos que permiten el establecimiento de criterios de calidad para la protección de la vida acuática, así como estándares de calidad ambiental para cada agente químico (Iannacone *et al.*, 2011).

Para medir la peligrosidad de un plaguicida o cualquier otra sustancia, es necesario conocer su toxicidad aguda. Para esto la ecotoxicología utiliza pruebas o ensayos de toxicidad, los cuales consisten en someter a organismos (especies que sirven como representantes de determinados niveles de organización trófica dentro de un ecosistema) en diferentes concentraciones de la sustancia prueba en un periodo corto de tiempo.

Cuantificándose comúnmente como la CL_{50} o DL_{50} , que se refiere a una mortandad del 50 % de los individuos sometidos a la sustancia. Para estas pruebas es necesaria la utilización de organismos bioindicadores, que deben ser individuos no destinatarios, de fácil colección y medición cuantificable.

US-EPA (1998), considera la ERA como un proceso que utiliza el procesamiento de datos, la información y las suposiciones para evaluar la probabilidad de que se produzcan o se estén produciendo efectos ambientales perjudiciales, como resultado de la exposición a uno o más estresores, los cuales pueden ser de naturaleza química como es el caso de los plaguicidas. INE (2003), comparte este concepto y añade que la evaluación del riesgo se vale de diferentes disciplinas para recoger información, así, la toxicología, la epidemiología, la ecología, la química, la física, las matemáticas, la ingeniería y las ciencias ambientales son una ayuda importante y constante en este tipo de trabajos.

Para una evaluación del riesgo, primero se debe identificar el riesgo (que evalúa la peligrosidad de una sustancia), y, posteriormente, valorarlo (ver la probabilidad de que cause efectos adversos).

En la identificación de la sustancia, nos dice que la peligrosidad de ésta se establece en función de sus propiedades intrínsecas, considerando la toxicidad para los organismos del medio (por ejemplo, la CL_{50}), su capacidad de bioacumulación y degradabilidad.

Mientras que, para la valoración, la literatura presenta dos formas. Una de ellas nos presenta Jerez *et al.*, (2016), los cuales indican que, para la valoración, se debe enfrentar la tasa de toxicidad-exposición (que son, por ejemplo, los datos de CL_{50} , CE_{50} , NOEC, etcétera), *versus* la concentración ambiental esperada (que es la concentración, en el ambiente que se está estudiando, de la sustancia a la que estarían expuestos los receptores biológicos). Para que no exista riesgo, el CL_{50}/CAE no debe exceder el nivel crítico o LOC (*Level of Concern*), para el ambiente estudiado. Mientras que, De la Torre *et al.*, (2004), expresan que la valoración del riesgo sigue los siguientes pasos:

- Evaluación de los efectos: se refiere al cálculo de la concentración prevista o PNEC (*Predicted no effect concentration*), por sus iniciales en inglés, el cual requiere hallar una concentración umbral sin efectos para diferentes organismos.
- Estimación de exposición: que es el cálculo de la concentración de las sustancias en el medio que se estudia (CAE).
- Cuantificación del riesgo: este se logra mediante los anteriores datos calculados (exposición y efecto), de tal manera que la exposición debe ser superior al PNEC e, igual que en la anterior forma, el $CAE/PNEC$, no debe exceder el LOC correspondiente para el ambiente estudiado.

Estos pasos se pueden resumir en el diagrama presentado en la Figura 17, la cual muestra los pasos para la planificación e implantación para proceder a realizar una evaluación del riesgo ambiental de las sustancias.



Figura 17. Diagrama general para la planificación e implantación de la evaluación de riesgo ambiental.

De todos los ecosistemas, el acuático cobra una gran importancia en los estudios toxicológicos debido a la gran variedad de químicos que se diluyen en él. Estos estudios facilitan datos que permiten el establecimiento de criterios de calidad para la protección de la vida acuática, así como estándares de calidad ambiental para cada agente químico (Iannacone *et al.*, 2011). Por lo general, las exposiciones se producen de forma simultánea o secuencial a un gran número de sustancias que ejercen su acción a través de una variedad de rutas. Estas sustancias se encuentran agrupadas y, dependiendo de su composición cuantitativa y cualitativa, se denominan mezclas simples y mezclas complejas (Feron & Groten, 2002). Una mezcla simple es aquella que está conformada por diez o menos productos químicos cuya composición es cualitativa y cuantitativamente conocida. Ejemplos de ellas son los cocteles de plaguicidas (Feron *et al.*, 1998). Una mezcla compleja está conformada por decenas, cientos o miles de sustancias químicas, cuya composición es cualitativa y cuantitativamente desconocida (Feron *et al.*, 1998).

La evaluación de los efectos tóxicos y la cuantificación de riesgos asociados a la exposición de mezclas químicas es un desafío importante para los científicos, evaluadores y entidades reguladoras (Feron & Groten, 2002; Spurgeon *et al.*, 2010). Esto principalmente se debe a la complejidad para comprender los efectos potenciales que pueden producir estas mezclas. Además, la presencia de algunos componentes podría enmascarar, diluir o aumentar

la toxicidad de otros componentes a través de diversas interacciones como sinergismo o antagonismo (National Research Council, 1988; Schwarzenbach *et al.*, 2006; Teuschler, 2007).

Hace más de 50 años, se definieron tres tipos básicos de acción para combinaciones de productos químicos (Bliss, 1939; Loewe & Muischnek, 1926; Plackett & Hewlett, 1948; Plackett & Hewlett, 1952): Acción similar (dosis/concentración adición); acción diferente (acción independiente) y la interacción.

Los productos químicos con modos de acción comunes pueden actuar juntos para producir efectos combinados que son mayores que los efectos de cada componente de la mezcla aplicado individualmente. Estos efectos pueden describirse mediante la adición de dosis/concentración (Tornero-Vélez *et al.*, 2011).

Para los productos químicos con diferentes modos de acción (acción independiente), no hay pruebas sólidas disponibles de que la exposición a una mezcla de dichas sustancias sea un problema para la salud si los productos químicos individuales están presentes en sus niveles de efecto cero o por debajo de ellos. Es importante tener en cuenta que los NO(A)EL y los NO(A)EC derivados de estudios experimentales no siempre representan niveles de efecto cero. A menudo se asocian con niveles de efecto de rango de 5 a 20 % y, por lo tanto, no hay “niveles de efecto cero”, por ello, las exposiciones iguales a estos niveles también pueden contribuir a efectos de mezcla para sustancias que actúan de manera diferente.

Las interacciones, sin embargo, son generalmente más difíciles de evaluar y requieren el juicio de expertos sobre un caso. La interacción describe el efecto combinado de dos o más productos químicos como más fuerte (sinérgico, potenciador, supraaditivo) o más débil (antagonista, inhibidor, subaditivo, infraaditivo) de lo que se esperaría sobre la base de la adición de dosis/concentración o la adición de respuesta. Por lo tanto, las interacciones pueden variar según los niveles de dosis relativas, la(s) ruta(s), el momento y la duración de la exposición (incluida la persistencia biológica de los componentes de la mezcla) y el(los) objetivos(s) biológico(s) (Tichý *et al.*, 2002).

En ecotoxicología, el objetivo no es la protección de los individuos, sino la protección de los niveles jerárquicos superiores (población, comunidad). Muchos procedimientos estándar de pruebas ecotoxicológicas están destinados específicamente a producir información a nivel de la dinámica de la población (p. ej., prueba de crecimiento de algas, prueba de fertilidad de *Daphnia*). Incluso las pruebas de toxicidad aguda a corto plazo se interpretan, en ecotoxicología, como pruebas comunitarias. Un nivel de mortalidad en una prueba en toxicología representa la probabilidad de que un individuo se vea afectado. Por el contrario, en ecotoxicología representa la fracción de la población que se vería afectada. De ello se deduce que los principios generales de la toxicidad de mezclas son aplicables en ecotoxicología para predecir los efectos a nivel de población y los conceptos de “acción independiente”, “adiciones de dosis/concentración” y “acción sinérgica” deben entenderse a nivel de la población (además del individuo y subindividuo).

BIOENSAYOS

Los bioensayos permiten determinar los efectos tóxicos de una sustancia y su repercusión en una población y su medio ambiente. Estos ensayos pueden evaluar la toxicidad de un compuesto de manera aguda o crónica utilizando especies representativas de diferentes niveles tróficos, representando el estado general del sistema en estudio al extrapolar los resultados a los demás niveles de la cadena trófica (Baker *et al.*, 2003; Castillo, 2004).

La ecotoxicología, rama de la ciencia definida por Butler en 1978, estudia y analiza los efectos de agentes químicos y físicos sobre organismos vivos, con particular atención a poblaciones y comunidades de ecosistemas definidos. Mientras que la ecotoxicología aplicada tiene como objetivo el desarrollo de protocolos de ensayo para ser utilizados como herramientas de predicción tempranas que permitan definir umbrales permisibles (Ronco, *et al.*, 2004).

El conocimiento de la toxicidad de las sustancias sólo puede obtenerse, aparte de las previsiones teóricas, por dos vías: estudios retrospectivos de casos de intoxicación y ensayos experimentales con animales y plantas. Sólo en muy contadas ocasiones se efectúa experimentación con seres humanos, debido a las implicaciones éticas y legales que ello

ocasiona; de estudios retrospectivos sobre intoxicaciones ocurridas en humanos se obtienen los datos de ‘toxicidad humana estimada’ (Repetto, 1988).

Es por esto, que es importante realizar estudios ecotoxicológicos en los ecosistemas. Para estos fines, el uso de bioensayos a través de indicadores biológicos (bioindicadores), definidos como especies particulares o sus comunidades que por su presencia y alteraciones que manifiestan, son una alternativa experimental que proporcionan información valiosa sobre el estado del entorno físico y químico circundante en un sitio en particular. Dentro de estos bioindicadores, los del primer nivel trófico son altamente sensibles al contacto de xenobióticos, entre ellos se incluye a *Artemia franciscana*, como representante del zooplancton (Begon *et al.*, 1999). *Artemia* es un modelo biológico adecuado para el estudio de la toxicidad sobre medios acuáticos, no sólo por ser un representante del primer nivel trófico como consumidor primario, sino por su facilidad para la eclosión de sus quistes, siendo la manutención y crecimiento en el laboratorio muy fácil usando un medio sintético similar a las condiciones de su hábitat natural. Las microalgas debido a su posición clave como productores primarios en sistemas ecológicos acuáticos, son indicadoras sensibles del cambio ambiental y, por tanto, son especies de prueba importantes para la evaluación reguladora de xenobióticos (Levy *et al.*, 2007). Entre los parámetros que pueden indicar un efecto tóxico de los agentes contaminantes sobre los organismos, el más estudiado y utilizado es la inhibición de crecimiento de las microalgas (Vázquez *et al.*, 2006).

BIOINDICADORES

La mayoría de los procedimientos utilizados en toxicología son llevados a cabo sobre mamíferos, pero está creciendo la presión pública para minimizar la utilización de vertebrados en ensayos de ecotoxicidad (Walter *et al.*, 1998; Repetto *et al.*, 2001).

Las alternativas más prometedoras en ecotoxicología abarcan la utilización de unos pocos organismos con sensibilidad limitada y/o que no están protegidos por la legislación. Estos incluyen bacterias, hongos, algas, plantas y animales invertebrados (Repetto *et al.*, 2001).

Los bioindicadores pueden definirse como especies o comunidades que particularmente, por su presencia, proporcionan información sobre el entorno físico y/o químico circundante

en un sitio en particular (Bellinger & Sigeo, 2015). En el contexto del cambio, los bioindicadores pueden ser considerados como marcadores de alerta temprana que reflejan el estado de "salud" de un sistema acuático (Bellinger & Sigeo, 2015).

De acuerdo con Roldán (1999), existen características ideales que debe cumplir un bioindicador:

- Deben ser abundantes, de amplia distribución y fáciles de recolectar.
- Relativamente fáciles de identificar, si se comparan con otros grupos menores.
- Ser sedentarios en su mayoría y reflejar las condiciones locales.
- Ser apreciables a simple vista.
- Se podrán cultivar en el laboratorio.
- Varían poco genéticamente.

IMPORTANCIA DE LOS INDICADORES BIOLÓGICOS

El uso de organismos para detectar procesos ecológicos y ambientales en los ecosistemas acuáticos tiene varias ventajas; una de ellas es que las poblaciones de animales y plantas acumulan información que, en muchos casos, los análisis físicos y químicos no detectan y evita la determinación regular de un número excesivo de parámetros. Se pueden distinguir algunos métodos biológicos para evaluar la calidad del agua: ecológicos, fisiológicos, bioquímicos y bioacumulación.

Existen muchos tipos de bioensayos que son accesibles y pueden realizarse en el campo o en el laboratorio y monitorearse de forma automática o manual. Los organismos que participan en tales ensayos incluyen (Kokkali, 2011): Algas y plantas, Microorganismos, Invertebrados.

ZOOPLANCTON

Suele ser considerado el grupo más importante en términos de densidad, biomasa, producción, consumo y regeneración de nutrientes (Hernández-Trujillo *et al.*, 2001).

Agrupar al conjunto de animales que vive a lo largo de la columna de agua, tanto en medios continentales como marinos. Estos animales son, principalmente, rotíferos y

crustáceos y, dentro de estos últimos, branquiópodos y copépodos. Dentro de las especies de zooplancton se diferencian las euplanctónicas, es decir, las que viven propiamente en la columna de agua, y las litorales, que se desarrollan preferentemente en las orillas, entre la vegetación acuática, en el perifiton o comunidad de algas que viven adheridas a las piedras de las orillas, o entre la materia orgánica, entre los productores primarios y los consumidores de zooplancton (normalmente los peces), su valor indicador de las condiciones ambientales es menor que el del fitoplancton (la comunidad de algas planctónicas). No obstante, su estudio permite obtener una visión más integradora y representativa del estado real de las aguas con las particulares condiciones ambientales en las que se desarrolla (Premazzi & Chiaudani, 1992; Monteoliva & Muñoz, 2000).

Artemia franciscana

El género *Artemia* engloba a un grupo de crustáceos caracterizados por estar dotados de apéndices torácicos en forma de hoja, que ejercen funciones locomotoras, respiratorias y filtradoras (Subclase *Branchiopoda*), y por la ausencia de caparazón rígido (Orden *Anostraca*), es un microcrustáceo, branquiópodo perteneciente al orden *Anostraca*.

El cuerpo presenta metamería uniforme. Como rasgos morfológicos (Figura 18) característicos destacan los siguientes: una cabeza formada por cinco segmentos fusionados, en la que se observan los ojos compuestos, un ocelo frontal entre aquellos, las anténulas o antenas secundarias y las antenas, también llamadas antenas verdaderas que, en el caso de los machos, se hipertrofian en apéndices prensiles. El tórax lo constituyen once segmentos, cada uno de ellos dotado de un par de apéndices foliáceos aplanados, llamados filópodos o toracópodos. El abdomen está constituido por ocho segmentos ápodos, genitales los dos primeros y, el último, llamado telson, provisto de la furca caudal. *Artemia* presenta dos tipos de reproducción: bisexual, anfigónica o zigogenética, con presencia de machos y hembras, y partenogénica, donde la presencia de machos es testimonial (Amat, Introducción general, 1985). Ambas modalidades se excluyen y no se ha encontrado ninguna cepa o variedad que pueda alternar cíclicamente ambas formas.

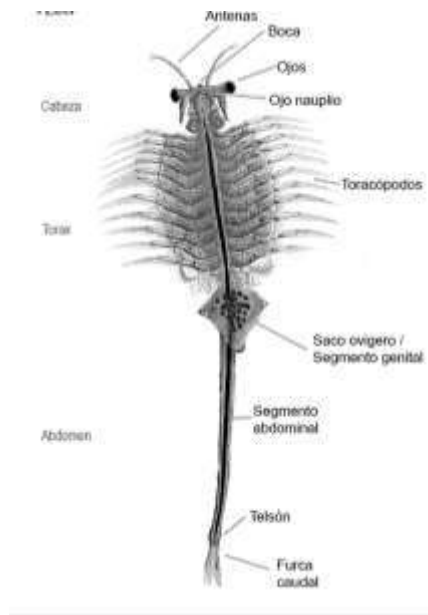


Figura 18. Morfología de *Artemia*. Tomado de Neli (2015).

Tanto en las poblaciones bisexuales como en las partenogénéticas, las hembras pueden dar lugar a dos tipos de huevos: los que completan el desarrollo embrionario en el interior del útero, por lo que resultan en un nauplio completamente formado (proceso ovovivíparo); y los que detienen su desarrollo en el estado de blástula avanzada o gástrula incipiente, cubriéndose de un corion resistente procedente de las glándulas de la cáscara y quedando en forma de quiste o huevo cística, de duración o de “invierno” (proceso ovíparo). Estos, pueden dar una eclosión inmediata con aparición de nauplios poco después de haber sido emitidos por las hembras (llamados quistes subitáneos), o entrar en un estado criptobiótico o de diapausa. En este caso, no eclosionan inmediatamente y deben ser activados para ello. Esta activación viene condicionada por una deshidratación previa, debida a los procesos osmóticos que se desencadenan en medios constituidos por fuertes salmueras, o a causa de la acción desecadora del aire y el sol. Cuando los quistes deshidratados son rehidratados de nuevo en agua de baja salinidad, con adecuados niveles de aireación e iluminación, los embriones enquistados continúan su desarrollo hasta eclosionar en forma de nauplio completamente formado durante el desarrollo emergente, se forma el nauplio o estado larvario I (Instar I), que ya nace nadando libremente en el medio. Tras la primera muda accede al estado larvario II, en el que ya empieza a capturar alimento externo, y con el que se entra a las formas metanaupliares que darán paso a las fases juveniles y adultas. El ciclo biológico

de *Artemia* (Figura 19 y Figura 20) dura aproximadamente de 14 a 17 días, aunque se han descrito ciclos más cortos, de hasta 9 días. En *Artemia*, el tamaño individual, la rapidez de desarrollo, la frecuencia de las mudas, etcétera, varían de acuerdo con la especie y a la influencia de factores fisicoquímicos y ambientales, tales como la salinidad, temperatura, concentración de oxígeno, pH, tipo de alimento y/o densidad poblacional (Abreu-Grobois, 1987).



Figura 19. Estadios de la eclosión de *Artemia*. Tomado de Aquaria (2018).



Figura 20. Ciclo de vida de *Artemia*. Tomado de Neli (2015).

Habitan en agua con altas concentraciones de sal. Es la especie de *Artemia* la que comúnmente se comercializa para fines alimenticios en acuicultura y acuariofilia por su gran abundancia. Resiste mejor los factores abióticos, lo que ha sido demostrado al observarse sobrevivencia y fecundidad significativamente mayor que las de otras especies (Triantaphyllidis *et al.*, 1995; Barata *et al.*, 1996). Además, tiende a presentar mejor éxito de colonizador si se introduce en nuevos hábitats, desplazando a la fauna nativa (Williams & Geddes, 1881). *A. franciscana* es dominante en el nuevo mundo, y se encuentra distribuida desde Canadá hasta la zona central de Chile. Esta especie en México se encuentra en “Las Salinas de Hidalgo”, San Luis Potosí, “Casa Blanca”, Cuatro Ciénegas, Coahuila, Yavaros, Ecatepec, Ceuta y San Crisanto (Figura 21) (Correa *et al.*, 1993; Malpica *et al.*, 2004).

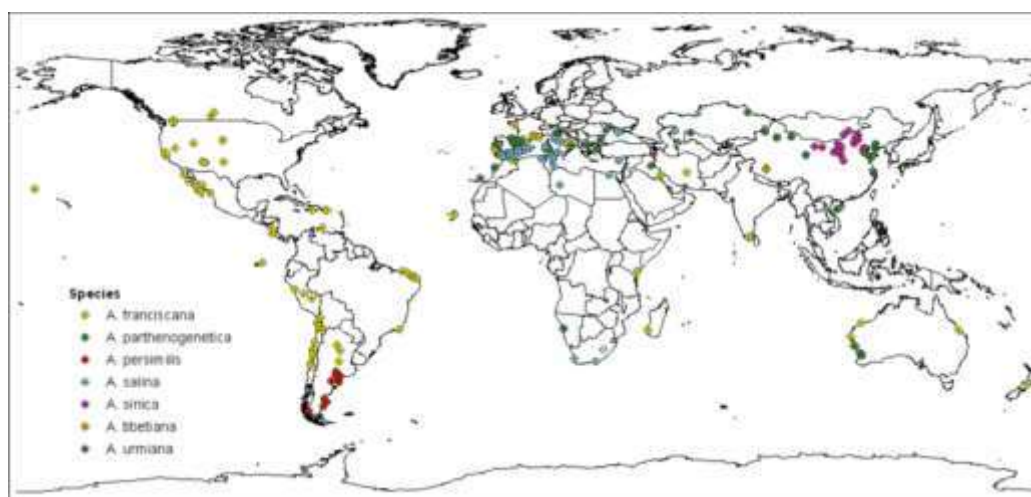


Figura 21. Mapa de distribución de *Artemia*. Tomado de Muñoz (2009).

La norma mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI establece un método biológico para la evaluación de la calidad del agua mediante pruebas de toxicidad aguda utilizando como bioindicador *Artemia franciscana*. Aplicable para la evaluación de toxicidad aguda en cuerpos de agua salobres y marinos, así como aguas residuales industriales, municipales y agrícolas, lixiviados, sustancias puras o combinadas y extractos acuosos con salinidades mayores a diez.

Debido a la facilidad de su cultivo, corto ciclo de vida, y a su distribución cosmopolita, *Artemia* ha ganado popularidad como organismo de prueba en estudios de toxicología y es una alternativa al uso de otros invertebrados por la posibilidad de obtener organismos

neonatos de forma sincrónica y con una condición fisiológica uniforme. Otra característica que hace a este organismo útil en estudios en toxicología es que puede ser cultivado en salinidades que varían entre 5 y 150 ups y se adapta a un amplio intervalo de condiciones ambientales.

FITOPLANCTON

El fitoplancton abarca el muy diverso grupo polifilético de los protistas fotosintéticos microscópicos (algas) y las cianobacterias. Hoy en día, representa aproximadamente la mitad de la productividad primaria de la Tierra (Falkowski *et al.*, 2004, Katz *et al.*, 2004). La composición del fitoplancton afecta profundamente a la comunidad de los ciclos biogeoquímicos de muchos elementos, como carbono, nitrógeno y fósforo, ya que los principales grupos funcionales tienen diferentes necesidades y modos de adquisición de estos elementos (Falkowski *et al.*, 2004). Muchas cianobacterias son capaces de fijar nitrógeno atmosférico y aumentan en la columna de agua (Capone *et al.*, 1997; Mullineaux *et al.*, 2008). Las diatomeas tienen una mayor eficiencia de captura de carbono en el océano profundo, debido a que sus conchas de sílice hacen que se hundan más rápido que otros grupos de fitoplancton (Smetacek, 1999), con un efecto directo sobre el clima global (Falkowski *et al.*, 1998). Grupos de fitoplancton también difieren en su comestibilidad y el valor nutricional de los niveles tróficos superiores (Sterner & Elser, 2002). Finalmente, muchas especies de fitoplancton pueden producir toxinas que afectan negativamente a la calidad del agua y a niveles tróficos superiores (Anderson *et al.*, 1998, Huisman *et al.*, 2005).

Muchas de las preguntas fundamentales de la ecología han sido formuladas y contestadas utilizando el fitoplancton como un sistema modelo. La llamada “Paradoja del Plancton” de Hutchinson (1961), que se hacía la pregunta de por qué muchas especies de fitoplancton pueden coexistir sólo en unos pocos recursos, en contra del principio de exclusión competitiva. Pues bien, ello derivó a que el fitoplancton fuera una de las primeras aplicaciones de la teoría de la competencia de los recursos (Tilman, 1977; Tilman *et al.*, 1982). Las microalgas forman parte de los ecosistemas acuáticos tanto marinos como dulceacuícolas, constituyendo la base de las cadenas tróficas. El fitoplancton es un excelente sistema modelo para abordar cuestiones ecológicas tan fundamentales debido a su pequeño tamaño, tiempos cortos de generación, un gran número de población, y la facilidad de

manipulación en condiciones controladas de laboratorio. Además, de que es el primer eslabón que soporta la cadena trófica acuática representando la base de la producción fotosintética de gran parte del O₂ y fijación de CO₂ del planeta. De esta manera, cualquier alteración sobre el fitoplancton produciría un desequilibrio potencial en los niveles tróficos superiores con consecuencias negativas para la estabilidad del ecosistema (Franklin *et al.*, 2006; Cortés *et al.*, 2018).

MICROALGAS VERDES

Las algas están ampliamente presentes en ambientes acuáticos. El término “alga” no es estrictamente un término taxonómico, sino que se usa como una etiqueta inclusiva para varios filos diferentes, estos organismos incluyen tanto procariotas (células que carecen de un núcleo unido a la membrana) como eucariotas (células con un núcleo más orgánulos típicos unidos a la membrana) (Bellinger & Sigee, 2015) como las microalgas verdes, las microalgas rojas, las diatomeas y los dinoflagelados o las cianobacterias procariotas (Figura 22) (Miazek *et al.*, 2015).



Figura 22. Morfología de algunos tipos de microalgas dulceacuícolas. Tomado de Frontera (2021).

Estos microorganismos fueron los responsables del cambio en la composición de la atmósfera primitiva hace unos 3500 millones de años, aumentando el nivel de oxígeno, originando una atmósfera rica en este gas, que ha permitido el desarrollo de la vida tal como la conocemos. Son responsables de al menos de la productividad primaria del planeta (Agah *et al.*, 2009).

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que utilizan la luz solar para convertir el CO₂ de la atmósfera en carbono orgánico. Atendiendo a la fuente de energía y de carbono de las microalgas se pueden cultivar en distintos modos (Miazek *et al.*, 2015):

- Autotrófico: utilizan luz, natural o artificial, como fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono.
- Mixotrófica: las microalgas realizan la fotosíntesis, pero en presencia de una fuente de carbono orgánico.
- Heterotrófico: La energía y el carbono se obtiene de la oxidación de sustratos orgánicos. No todas las especies de microalgas pueden crecer en heterotrofia, ya que los costes de operación y riesgos de contaminación son elevados.

Debido a su posición clave como productores primarios en sistemas ecológicos acuáticos, las microalgas son indicadores sensibles del cambio ambiental y, por tanto, son especies de prueba importantes para la evaluación reguladora de metales (Levy *et al.*, 2007).

Dentro de los ecosistemas de agua dulce, las algas aparecen como organismos de flotación libre (planctónicos) o asociados a sustratos (en gran parte benthicos) (Bellinger & Sigee, 2015). Son organismos simples, sin diferenciación en raíces, tallos y hojas, y sus órganos sexuales no están encerrados dentro de cubiertas protectoras. En términos de fisiología, son fundamentalmente autótrofos (obtienen todos sus materiales de fuentes inorgánicas) y generan compuestos de carbono complejos a partir de dióxido de carbono y energía luminosa (Tuchman, 1996).

Las algas de agua dulce proporcionan dos tipos principales de información sobre la calidad del agua (Bellinger & Sigee, 2015):

- Información a largo plazo, en el caso de un lago templado, por ejemplo, la detección de una intensa floración de microalgas es indicativo de un estado preexistente de alto contenido de nutrientes.
- Información a corto plazo, como el cambio ambiental. La detección de un cambio en los años subsecuentes desde un bajo a un alto dominio de microalgas puede indicar un cambio en el estado eutrófico.

En el ambiente de agua dulce, las algas verdes (*Chlorophyta*) varían en tamaño desde organismos unicelulares microscópicos hasta grandes colonias globulares y extensos crecimientos filamentosos. Se caracterizan por una coloración verde fresca debido a la presencia de clorofilas como la clorofila a y b (Tabla 5), que no están ocultas por pigmentos accesorios como el β -caroteno y otros carotenoides. En los casos en que las algas tienen una exposición excesiva a la luz los pigmentos carotenoides pueden ser fotoprotectores y aparecer en niveles altos, oscureciendo las clorofilas y dando un color rojo brillante al alga (Bellinger & Sigeo, 2015).

Tabla 5. Tipo de clorofila en microalgas y cianobacterias. Tomado de Miazek *et al.*, 2015.

Tipo de clorofila	Variedad de microalga	Taxonomía
a,b	<i>Chlorella vulgaris</i>	Microalga verde
a,c1,c2	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Diatomea
a,c1,c2	<i>Kryptoperidinium foliaceum</i>	Dinoflagelada
a,c1,c3	<i>Karenia mikimotoi</i>	Dinoflagelada
a,d	<i>Acaryochloris marina</i>	Cianobacteria
a,f	<i>Halomicronema hongdechloris</i>	Cianobacteria

Además de su pigmentación característica, Bellinger & Sigeo (2015), mencionan que las algas verdes también tienen una serie de divisiones citológicas distintivas:

- Los flagelos, cuando están presentes, se presentan en pares. Estos son de igual longitud sin pelos tubulares tripartitos y tienen una estructura similar. Algunos géneros tienen cuatro o incluso ocho flagelos, pero esto es inusual.
- Los cloroplastos varían en forma, tamaño y número. Tienen una doble membrana externa, sin retículo endoplasmático periplastidal.
- La producción y el almacenamiento de la reserva fotosintética (almidón) ocurren dentro del plástido, con gránulos frecuentemente agrupados alrededor del pirenoide. En todas las algas eucariotas, el material de almacenamiento se produce principalmente en el citoplasma general.

Aunque la motilidad se asocia normalmente con la posesión de flagelos, algunas algas pueden moverse sin la ayuda de flagelos por la secreción de mucílago de la superficie. En muchas algas, la presencia de mucílago en la superficie es importante para aumentar el tamaño global de las células/colonias e influir en la forma (Bellinger & Sigee, 2015).

Las preferencias de hábitat de las algas verde contemporáneas son frecuentemente útiles para proporcionar información sobre las características fisicoquímicas del medio ambiente acuático. Las algas verdes filamentosas, por ejemplo, a menudo dominan ambientes estresados por la eutrofización cultural, la acidificación y la contaminación por metales (Cattaneo *et al.*, 1995).

El tamaño y la forma, junto con otras características fenotípicas importantes, son claramente importantes en la clasificación e identificación de las especies de algas. A nivel funcional y ecológico, el tamaño y la forma también son importantes en términos de intercambio de solutos y gases, absorción de luz, tasas de crecimiento y división celular, sedimentación en la columna de agua y motilidad de células/colonias (Sigee, 2005).

Las microalgas demuestran una amplia gama de formas y varían en varios órdenes de magnitud en tamaño. Las células de microalgas son capaces de sintetizar numerosos compuestos en cantidades más altas, como respuesta a condiciones de estrés tales como alta temperatura, alta salinidad, falta de nutrientes y también estrés por metales. Sin embargo, las condiciones de estrés también pueden tener efectos negativos en el crecimiento de las microalgas (Miazek *et al.*, 2015). Por otro lado, los metales a bajas concentraciones pueden estimular el crecimiento y la producción de compuestos objetivo, pero la sobredosis de

metales tiene efectos perjudiciales y letales en los cultivos de microalgas. La respuesta de las células microalgales a la presencia de metales depende de muchos factores, como las condiciones de cultivo, la disponibilidad de nutrientes, la presencia de compuestos orgánicos y la capacidad de tolerancia de determinadas cepas (Miazek *et al.*, 2015).

La acumulación de metales en células de microalgas consiste en dos mecanismos (Figura 23):

- La adsorción de metales en la superficie de la pared celular que contiene grupos funcionales (carboxilo, hidroxilo, fosfato, amino, sulfhidrilo).
- La absorción de metales dentro de las células mediante sistemas de transporte de metales.

Los metales en las células de microalgas pueden causar la formación de especies reactivas de oxígeno, que interactúan con los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, resultando en su degradación.

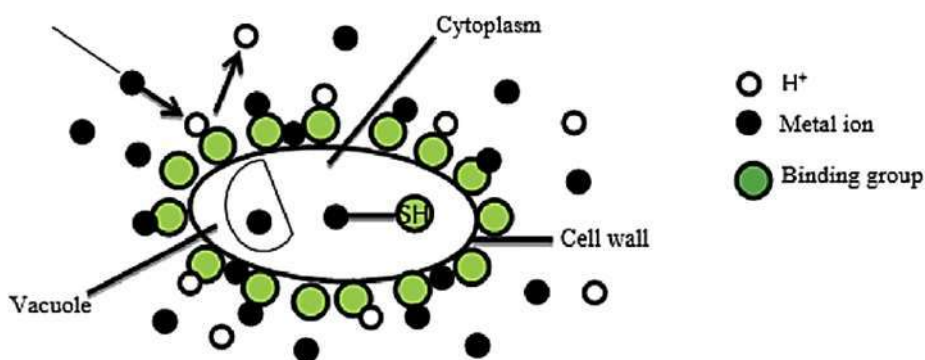


Figura 23. Mecanismo y diferentes grupos funcionales que participan en la biosorción de iones metálicos en microalgas (SH⁻, COO⁻, OH⁻, PO₄⁻, etcétera). Tomado de Zeraatkar *et al.*, 2016.

La mayoría de los estudios sobre aguas dulces, han utilizado la comunidad fitoplanctónica para la evaluación ambiental contemporánea, ya que es la principal biomasa de algas, se toman muestras fácilmente en sitios a lo largo de estos ecosistemas y muchas especies planctónicas tienen preferencias ecológicas definidas. Así como la determinación de la biomasa del fitoplancton es importante ya que proporciona información sobre la

productividad primaria del sistema acuático y la cantidad del material orgánico disponible para el consumo del resto de la cadena trófica (Bellinger & Sigeo, 2015).

Scenedesmus intermedius

La especie seleccionada para el presente estudio es una especie de microalga verde dulceacuícola, *Scenedesmus intermedius* en la clase Chlorophyceae de familia Scenedesmaceae y de género *Scenedesmus* (Figura 24). Es uno de los géneros de algas eucariotas de agua dulce más comunes, especialmente en aguas eutróficas e hipertróficas (Quevedo *et al.*, 2008).

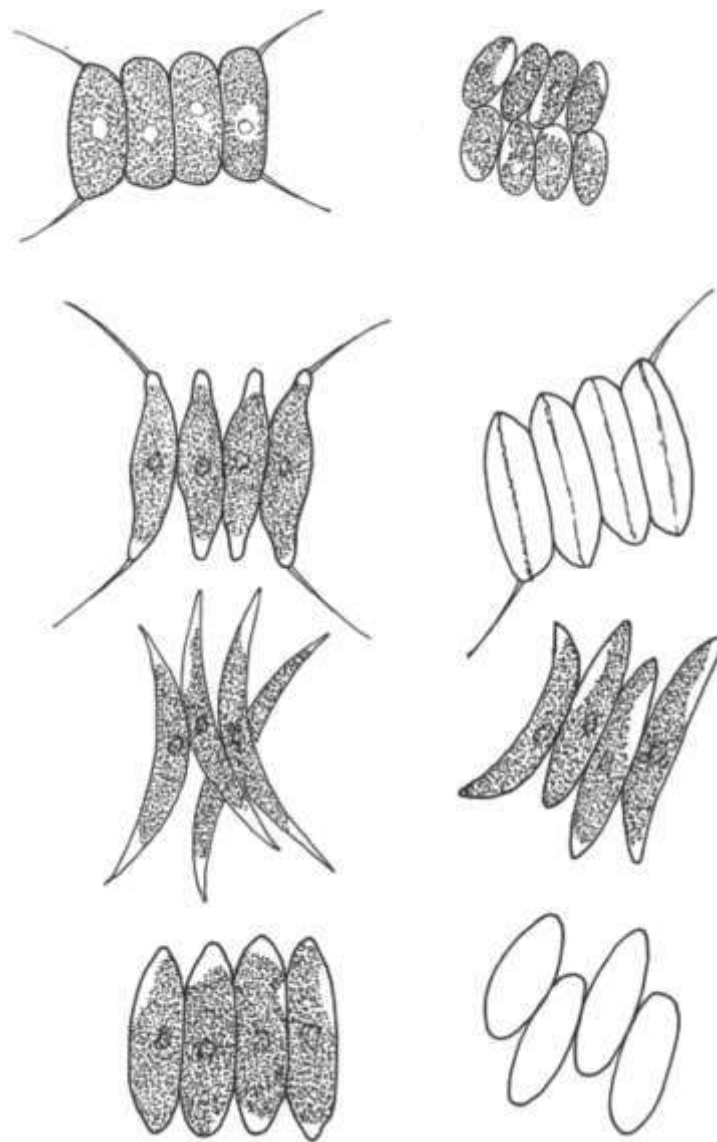


Figura 24. Especies de *Scenedesmus*. Tomado de Bellinger & Sigeo (2015).

Scenedesmus intermedius se localiza en poblaciones unicelulares y pequeñas colonias de rápido crecimiento. Sus células tienen forma cilíndrica (o con forma elipsoidal o fusiforme) y generalmente más largas que anchas. Miden 3.5 μm a 12.5 μm de altura y 1.6 μm a 7.5 μm de diámetro. Las células pueden existir en forma unicelular, aunque también se encuentran con frecuencia en la cenobia de 2, 4 u 8 células unidas por las paredes laterales (Bellinger & Sigee, 2015) (Figura 25).



Figura 25. Morfología de *Scenedesmus intermedius*. Tomado de Bellinger & Sigee (2015).

Las paredes celulares están compuestas en su mayor parte de celulosa. Las capas de celulosa intervienen total o parcialmente en la estructura de las células hijas. En el interior de la célula aparecen los cloroplastos de uno hasta numerosos cloroplastos, en ellos puede aparecer orgánulos mayormente esféricos: los pirenoides, constituidos fundamentalmente por proteínas pudiendo estar rodeados o no de almidón. La matriz del pirenoides puede encontrarse atravesada por tilacoides. También cuentan con un núcleo y vacuolas que aparecen generalmente en las células más viejas (Hernández & Labbé, 2014).

Para *S. intermedius*, la reproducción es mediante autoesporulación (asexual), ocurre principalmente mediante el rompimiento o gelatinización de la pared celular materna. Así,

las hijas crecen juntas en un nuevo cenobio en el interior de la célula madre (Quevedo *et al.*, 2008).

Bajo condiciones de estrés, las células de *Scenedesmus* pueden dividirse en dos subgéneros: *Scenedesmus* sin espinas y *Scenedesmus* con espinas. Aunque en el primer caso, las células cuentan con paredes de células gruesas y mucílago, lo que puede hacerlas resistentes a la digestión. Las espinas que llegan a formar las células es un mecanismo para desalentar la depredación (Bellinger, 2015).

Estas microalgas poseen una alta sensibilidad frente a un amplio grupo de contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos (Haglund, 1997) y responden a ellos de forma rápida debido a su tiempo de generación corto (DeLorenzo *et al.* 2002; Rioboo *et al.*, 2007). Estas características hacen de estos microorganismos unos buenos indicadores biológicos de contaminantes en medio acuáticos (Rosenström Lepistö, 1996). Las especies de microalgas son comúnmente utilizadas para ensayos de toxicidad porque se adaptan fácilmente a las condiciones de laboratorio, son sensibles a compuestos químicos y tienen una capacidad de crecimiento rápido.

BACTERIAS MARINAS LUMINISCENTES

En los seres vivos, la emisión de luz puede ser de dos tipos: fotoluminiscencia (fosforescencia y fluorescencia), debida a la presencia de moléculas fotoexcitables que absorben la luz a una determinada longitud de onda y la emiten a una longitud de onda mayor, y la quimioluminiscencia, que en organismos vivos recibe el nombre de bioluminiscencia, en que la energía química procedente de una reacción química exergónica se transforma en energía luminosa, por lo que no depende de la absorción previa de la luz (Martín *et al.*, 2010) (Figura 26).

Entre los microorganismos, algunas bacterias, protistas (fundamentalmente dinoflagelados) y hongos son bioluminiscentes. Sin embargo, este proceso no es exclusivo del mundo microbiano, también se presenta en ciertas plantas y animales.

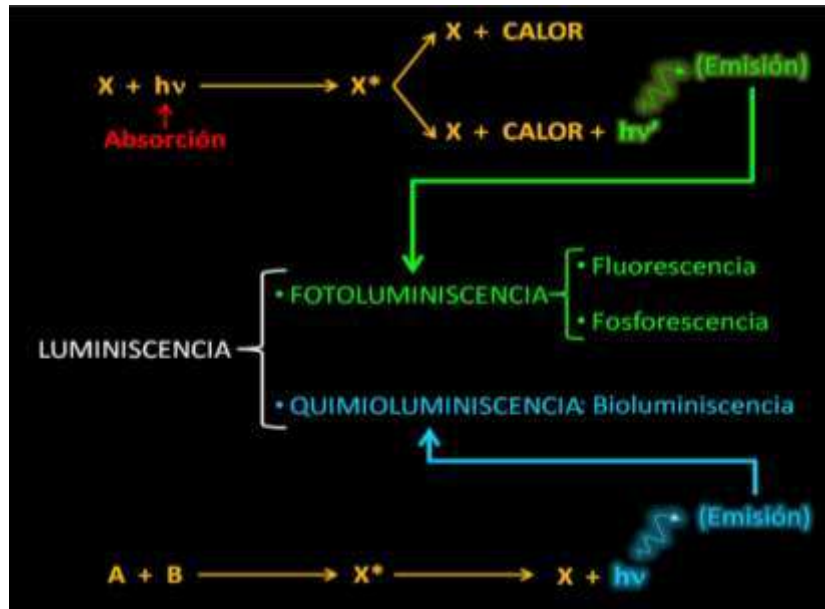


Figura 26. Tipos de emisión de luminiscencia en los seres vivos. Tomado de Martín *et al.* (2010).

Las enzimas que catalizan las reacciones de bioluminiscencia reciben el nombre genérico de luciferasas. Los sustratos de esta reacción se suelen denominar luciferinas. La estructura de ambos componentes y las características de la reacción son muy diferentes en los diversos sistemas biológicos, lo cual indicaría distintos orígenes evolutivos. La única característica común en todos los organismos/microorganismos que emiten luz es el requerimiento de oxígeno, requisito en la reacción bioluminiscente (Haddock *et al.*, 2010).

Existe una gran diversidad de bacterias bioluminiscentes de ambientes marinos, la mayoría de las cuales son Gramnegativas, aunque también se han descrito algunas especies en medios edáficos y de agua dulce. Los géneros más representativos de bacterias bioluminiscentes marinas son *Vibrio*, *Photobacterium* y *Alteromonas*, siendo las especies más comunes *V. harveyi*, *V. fischeri*, *P. phosphoreum*, *P. leiognathi* y *A. hanedai*. Todas ellas son quimiorganótrofas y anaerobias facultativas y se encuentran ampliamente distribuidas, tanto en zonas costeras como en mar abierto. En estos hábitats marinos alcanzan densidades elevadas que oscilan entre $1 - 6 \cdot 10^3$ células mL^{-1} (Meighen, 1993).

La reacción, catalizada por la luciferasa bacteriana, consiste en la oxidación por oxígeno moléculas de un aldehído mirístico o tetradecanal (RCHO) y un flavínmononucleótido reducido (FMNH₂), dando como resultado la emisión de luz de color verde-azul, con un máximo de emisión *in vitro* a 490 nm (Figura 27) (Roda *et al.*, 2004).

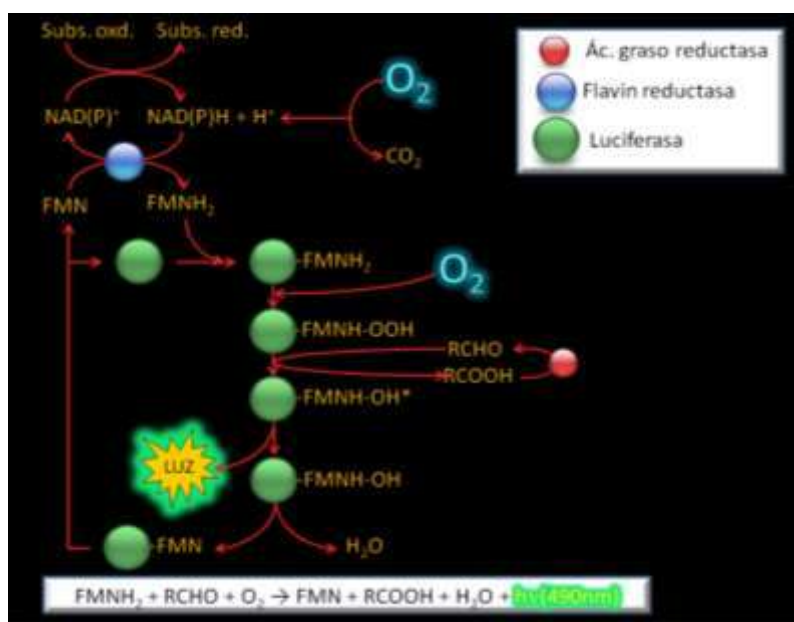


Figura 27. Emisión de luz dependiente de la enzima luciferasa. Tomado de Martín *et al.* (2010).

Esta reacción biológica supone un elevado gasto energético para la célula, que se obtiene a expensas de la respiración anaerobia del microorganismo. Las luciferasas bacterianas son enzimas heterodiméricas (76 – 80 kDa), constituidas por dos subunidades: una pesada (α) y una ligera (β). Ambas subunidades son necesarias para la actividad catalítica. Acoplada a la reacción de emisión de luz catalizada por luciferasa, se lleva a cabo una reacción de reciclaje del aldehído mirístico, catalizada con el complejo multienzimático ácido mirístico-reductasa (ácido graso reductasa). Los genes involucrados en la bioluminiscencia bacteriana se denominan genes *lux*, entre los cuales se encuentran los genes estructurales *luxICDABE(G)* que codifican para las proteínas que participan directa o indirectamente en la reacción de emisión de luz: luciferasa y ácido mirístico reductasa, junto

con genes reguladores de la transcripción y la biosíntesis de un autoinductor (Wilson & Hastings, 1998).

El primer sistema biológico regulado por *quorum sensing* estudiado fue la bioluminiscencia de la bacteria marina *V. fischeri*, simbiote mutualista del calamar *Euprymna scolopes*. El sistema de *quorum sensing* de esta bacteria es el más sencillo descrito (Figura 28) y con un único autoinductor, una acil-homoserín-lactona. Cuando la densidad celular es baja, no se expresan los genes estructurales *lux* y no se produce la bioluminiscencia (Nyholm & McFall-Ngai, 2004).

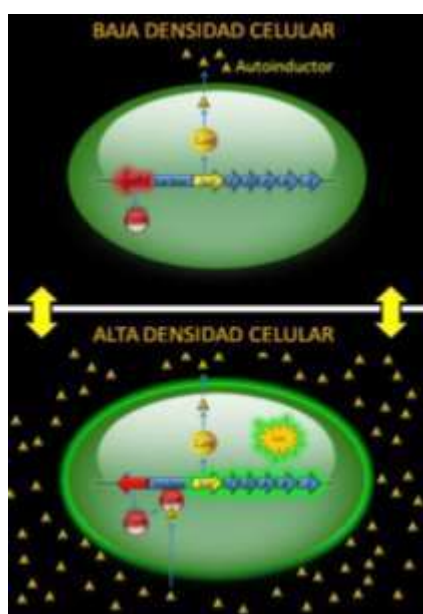


Figura 28. Control por *quorum sensing* de la bioluminiscencia en *V. fischeri*. Tomado de Martín *et al.* (2010).

Vibrio fischeri

La bacteria *Vibrio Fischeri* es una bacteria gram negativa, es decir, que se tiñe de color rosáceo para su visualización, que tiene forma de barra, anaerobia facultativa, que pueden vivir en presencia o en ausencia de oxígeno. Pertenece a la familia Vibrionaceae cuya característica más representativa es la bioluminiscencia (producción de luz por parte de ciertos organismos vivos), la cual habita en todos los ambientes marinos donde se encuentra predominantemente en relaciones de simbiosis con varios animales marinos, principalmente

en moluscos. Una de sus principales características son sus propiedades bioluminiscentes, La investigación en ecotoxicología con diferentes especies de bacterias luminiscentes ocupa un importante lugar en la evaluación de los contaminantes del agua en ciertos ecosistemas. Sus características genéticas, fisiológicas, nutricionales y funcionales han sido evaluadas comparando los cambios que se producen en estos organismos, fundamentalmente en presencia de agentes tóxicos. Ello ha dado lugar a la existencia de protocolos normalizados con bacterias luminiscentes para ensayos de toxicidad. *Vibrio fischeri* se ha utilizado con frecuencia, ya que es un organismo conocido y los protocolos operativos están estandarizados ya que las pruebas de bioluminiscencia de inhibición ofrecen respuestas robustas, fáciles de manejar y rentables (Salizzato *et al.*, 1998).

La prueba de bioluminiscencia nos indica el nivel de toxicidad en función a la inhibición metabólica por medio de agentes nocivos que afectan la población bacteriana y viene regulada, el método que determina la toxicidad aguda está basado mediante el ensayo descrito en la normatividad nacional NMX-AA-112-SCFI (Análisis de Agua y Sedimento - Evaluación de Toxicidad Aguda con *Vibrio fischeri* – Método de Prueba) y por la ISO 11348-2:2007: Es importante destacar la estabilidad en la emisión de luz, así como la gran sensibilidad que presenta a una amplia variedad de sustancias tóxicas. La reacción de bioluminiscencia bacteriana está ligada al sistema de transporte de electrones en la respiración celular y es indicativa del estado metabólico de la célula, de modo que una disminución de la bioluminiscencia indica la disminución de la respiración celular. Los contaminantes físicos, químicos y biológicos afectan a la respiración celular alterando el porcentaje de síntesis de proteínas y lípidos y modificando por tanto el nivel de emisión de luminiscencia. En presencia de agentes contaminantes, la bioluminiscencia natural de *Vibrio fischeri* disminuye. La prueba de bioluminiscencia consiste en la medida de la luz emitida por las bacterias *Vibrio fischeri* antes de entrar en contacto con la muestra y después de contactar con ella pasado un tiempo de incubación. Es asumible que la diferencia de luminosidad observada es debida al efecto de la muestra. El grado de pérdida de luz indica el grado de toxicidad de la muestra.

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

A través de los años, la agricultura ha sufrido cambios radicales. A pesar de los buenos resultados iniciales con el uso de plaguicidas y del incremento en los rendimientos, comenzaron a notarse efectos deletéreos en el ambiente y en la salud de las personas. Esto fue atribuido a la alta actividad biológica y a la toxicidad, tanto agudo como crónica, de los productos fitosanitarios.

Los plaguicidas inorgánicos que utilizan cobre como principio activo, producen daños a diferentes tipos de cultivos; además, pueden llegar a acumularse en suelos con efectos negativos sobre el medio ambiente y en la biodiversidad del ecosistema donde son aplicados, añadiendo a este problema su capacidad para viajar por escorrentías y efluentes de agua hasta terminar en lagos y mares ejerciendo allí también sus efectos tóxicos. Además, debido a su amplio uso, se presentan fácilmente en el medio ambiente, incluyendo suelos y aguas, donde coexisten con otro tipo de plaguicidas, entre ellos los orgánicos como el glifosato, por lo tanto, la interacción tanto química como de la suma de sus efectos entre estas sustancias es de esperarse. Por ello se requiere del estudio de estas sustancias para determinar el efecto que pueden presentar sus combinaciones, ya sean de tipo sinérgico, aditivo o antagónico.

La conciencia social acerca de la protección del medio ambiente está en aumento en las últimas décadas, lo que promueve la búsqueda de líneas científicas para combatir la contaminación y evaluarla; de hecho, aportar datos para mejorar la evaluación de la ecotoxicidad acuática, es una necesidad incluida en el IPCS (Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas) y hoy se reconoce que los estudios realizados sobre la toxicidad de metales aún son insuficientes y siguen siendo una prioridad.

En los estudios toxicológicos se utilizan bioensayos para la obtención de datos, por medio de la relación contaminante-respuesta biológica, de tal manera que, al utilizar especies que representan organismos acuáticos como bioindicadores (caso de especies planctónicas), permite no solo el desarrollo de metodologías alternativas a los tradicionales ensayos con mamíferos, lo cual evita la presión pública para minimizar la utilización de vertebrados en ensayos de ecotoxicidad, si no que, al pertenecer a los primeros niveles de la cadena trófica (productores), los datos proporcionados posibilitan alertas tempranas de peligros ambientales

causados por la contaminación, ya que estos datos pueden extrapolarse a niveles tróficos superiores.

En la legislación de varios países como Estados Unidos, Canadá y los de la Comunidad Europea, entre otros, se han incluido los ensayos con microorganismos vivos para cuantificar el grado de toxicidad de efluentes industriales, aguas residuales y/o residuos sólidos, para determinar los límites de descarga y los efectos tóxicos sobre la biota, en concreto el alga *Scenedesmus intermedius*, perteneciente al fitoplancton, o *Artemia franciscana*, perteneciente al plancton, son utilizados como bioindicadores y se encuentran incluidos dentro de las especies recomendadas por los protocolos definidos por varias instituciones de estandarización como la OECD por su alta sensibilidad a un considerable número de xenobióticos. Por otro lado, la investigación en ecotoxicología con diferentes especies de bacterias luminiscentes ocupa un importante lugar en la evaluación de los contaminantes del agua en ciertos ecosistemas. Sus características genéticas, fisiológicas, nutricionales y funcionales han sido evaluadas comparando los cambios que se producen en estos organismos, fundamentalmente en presencia de agentes tóxicos. Ello ha dado lugar a la existencia de protocolos normalizados con bacterias luminiscentes para ensayos de toxicidad como es el caso de la bacteria marina *Vibrio fischeri*.

Por todo lo anterior, en este trabajo se pretende determinar que la presencia de oxiclورو de cobre en el ambiente genera una respuesta tóxica sobre ecosistemas acuáticos a nivel del plancton, por medio de tres bioindicadores, el microcrustáceo *Artemia franciscana*, la microalga *Scenedesmus intermedius* y sobre la bacteria marina *Vibrio fischeri*.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

¿En qué grado la presencia de oxiclورو de cobre en el ambiente acuático genera una respuesta tóxica sobre el microcrustáceo *Artemia franciscana* y la microalga *Scenedesmus intermedius* y disminución de la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri*?

HIPÓTESIS

La presencia de plaguicidas basados en cobre (Oxicloruro de cobre y Sulfato de cobre) y orgánicos (Gifosato) en el ambiente genera una respuesta tóxica sobre ecosistemas acuáticos a nivel de representantes del plancton: microcrustáceo *Artemia franciscana*, microalga *Scenedesmus intermedius* y la bacteria marina *Vibrio fischeri*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial efecto tóxico agudo del plaguicida oxiclورو de cobre, utilizado como bioindicadores a representantes planctónicos de ecosistemas dulceacuícolas: *Scenedesmus intermedius*, de ecosistemas salinos: *Artemia franciscana* y a la bacteria marina *Vibrio fischeri*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la CL₅₀ del plaguicida oxiclورو de cobre sobre nauplios de *Artemia franciscana* tras 24 horas de exposición y determinar la concentración más alta a la cual no se observan efectos (24 h-NOEC) sobre nauplios de *Artemia franciscana*.
- Evaluar la toxicidad aguda del oxiclورو de cobre a través de la CI₅₀ a los siete días de exposición sobre la microalga *Scenedesmus intermedius* y determinar la concentración a la cual no se observó efecto (NOEC) a los siete días de exposición del oxiclورو de cobre sobre *Scenedesmus intermedius*.
- Comparar la toxicidad aguda del oxiclورو de cobre con el sulfato de cobre y el glifosato.
- Determinar la toxicidad en mezcla del fungicida oxiclورو de cobre y el herbicida glifosato muy usados en conjunto.

- Determinar la CE_{50} del oxiclóruo de cobre sobre la bacteria marina *Vibrio fischeri* a través del ensayo por bioluminiscencia.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

SUSTANCIA DE ENSAYO

La sustancia de ensayo utilizada fue el fungicida Oxiclóruo de Cobre [$\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$] con una pureza de 92.4 % con un contenido de 59.5 % de cobre en concentración no menor de 550 g Cu kg^{-1} de Oxiclóruo de Cobre (Agrocuper Ecovert, Agroquímica S. A. de C. V., México). Se trabajó en concentraciones crecientes del fungicida en un rango de 10 a 100 mg L^{-1} en las pruebas realizadas sobre *Scenedesmus intermedius* y *Artemia franciscana*.

Fungicida y alguicida Sulfato de Cobre (CuSO_4) con una pureza del 99 % con un contenido de cobre en concentración no menor de 245 g Cu Kg^{-1} de sulfato de cobre (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Se trabajó en concentraciones crecientes del fungicida de 1 a 10 mg L^{-1} en las pruebas realizadas sobre *Scenedesmus intermedius* y en un rango de 10 a 100 mg L^{-1} en las pruebas realizadas sobre *Artemia franciscana*.

Herbicida organofosforado Glifosato [$\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$] (La FAM ®), con una pureza del 97 % con un contenido de glifosato ácido [N-(fosfonometil) glicina] no menor de 74 % en concentración de 480 g L^{-1} de sal isopropilamina de glifosato. Se trabajó a concentraciones crecientes del herbicida en un rango de 1 a 10 mg L^{-1} en las pruebas realizadas sobre *Scenedesmus intermedius* y en un rango de 0 a 1 mg L^{-1} en las pruebas realizadas sobre *Artemia franciscana*.

AGUA MARINA SINTÉTICA

El agua marina sintética se preparó pesando 35 g de Sal Marina (Sea Salt, Sera Premium, Germany), la cual se diluyó en 1000 ml de agua bidestilada hasta solución transparente. El pH se ajustó con solución de HCl 0.1 M en caso de tener pH básico o con solución de NaCl 0.1 M en caso de ser ácido, hasta un pH en el rango de 8 a 8.6.

MEDIO DE CULTIVO BG-11

El medio de cultivo BG-11 se preparó bajo condiciones asépticas empleando agua tridestilada. Para el medio experimental se hizo una disolución 1:100, es decir, para 1000 ml se disolvió 10 ml de BG-11 basal en 990 ml de agua tridestilada estéril. El pH se ajustó a 7.1

con solución de NaOH 1 M. Una vez preparada la solución se mantuvo en refrigeración (2-8 °C) en frascos estériles. Su composición se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición del medio BG-11 solución estéril, 100x concentrado (Fluka Analytical).

Nitrato de sodio	1.5 g L ⁻¹
Fosfato de hidrógeno dipotásico	31.4 mg L ⁻¹
Sulfato de magnesio	36 mg L ⁻¹
Cloruro de calcio dihidratado	36.7 mg L ⁻¹
Carbonato de calcio	20 mg L ⁻¹
EDTA magnesio disódico	1 mg L ⁻¹
Ácido cítrico	5.6 mg L ⁻¹
Citrato de amonio férrico	6 mg L ⁻¹
pH 4.0 – 4.6 a 25 °C (no ajustado)	

MATERIAL BIOLÓGICO

Scenedesmus intermedius fue obtenida de la colección de cultivos de microalgas de la Unidad de Genética, de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España, las cuales se mantienen en cultivo axénico a 21 °C y periodo de luz-oscuridad de 12:12 h a una intensidad fotónica de 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en matraces de cultivo (Greiner; Bio-One; GmbH, Germany), con 20 ml de medio de cultivo BG-11 (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Artemia franciscana fue obtenida a partir de la eclosión de quistes (Argent Chemical Laboratories, Washington, USA) por incubación en agua marina (Sera Premium, Germany),

con concentración salina de 34 g L^{-1} , pH de 8.4 ± 0.2 por 24 horas a una temperatura de 28°C y una intensidad lumínica de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figura 29).



Figura 29. Diagrama de la obtención de nauplios de *A. franciscana* de 24 horas.

Vibrio fischeri (conocida anteriormente como *Photobacterium phosphoreum*, NRRL No. B-11177) fue obtenida de una preparación seca-congelada (-20°C) de un cultivo selecto de una cepa de la bacteria marina (Microtox®, Microbics Corporation, Carlsbad, CA, USA), resuspendida y atemperada en solución no tóxica de NaCl al 2 % a 15°C durante cinco minutos.

DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD DE *Artemia franciscana*

Se procedió a determinar la $CL_{50(24h)}$, que es aquella que causa la muerte del 50 % de nauplio de *Artemia franciscana* tras 24 horas de exposición al agente tóxico, mediante intoxicación aguda con el pesticida Oxicloruro de Cobre en una placa multipocillo (Sarstedt Inc., USA), de acuerdo con la técnica descrita por Persoone *et al.*, (1989). En cada pocillo fueron incluidos 10 nauplios de *A. franciscana* que fueron expuestos a diferentes concentraciones del agente tóxico $[\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}]$ en un volumen total de 1 ml. Se incluyó una

línea de pocillos control (sin agente tóxico) y se realizaron 9 repeticiones ($n = 9$), en incubación a 28 °C por 24 horas en ausencia de luz. Para cuantificar el número de nauplio muertos en cada pocillo, se realizó la lectura a través de estereoscopio (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany), para considerar los nauplios como muertos se utilizó el criterio de observar inmovilidad por al menos diez segundos (Figura 30).

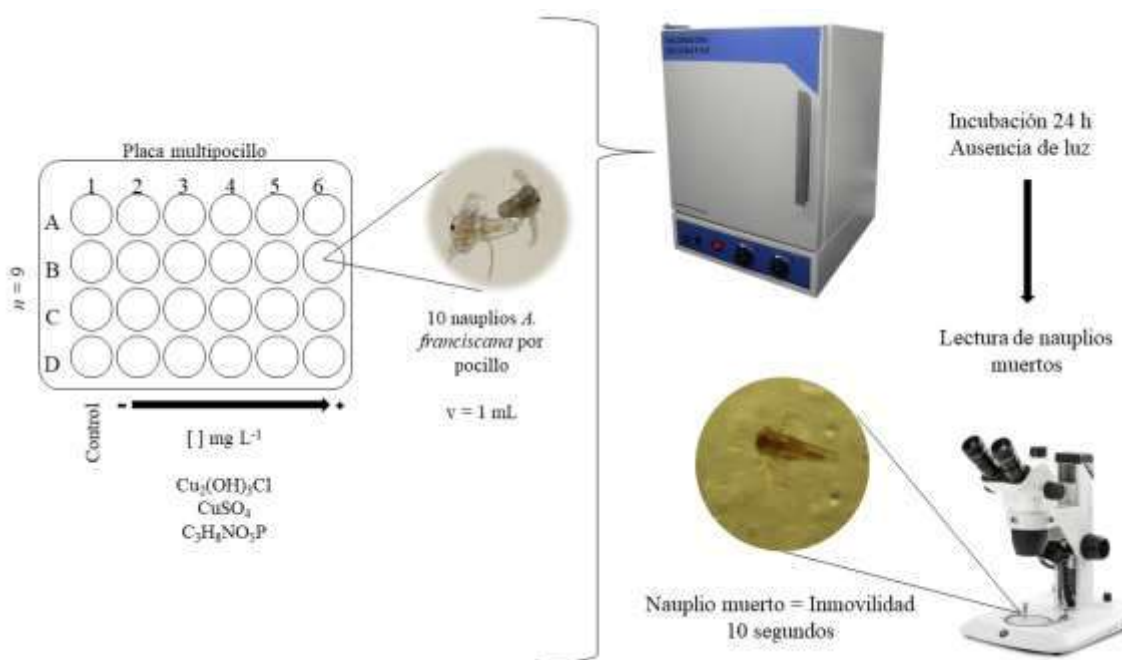


Figura 30. Diagrama del procedimiento descrito por Persoone *et al.* (1989), para la determinación de mortalidad de *A. franciscana*.

ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus intermedius*

Para la determinación de la $\text{CI}_{50(7d)}$, que consiste en la concentración de la inhibición de crecimiento en cantidad a la mitad de una población de la microalga verde *Scenedesmus intermedius* expuesta a un xenobiótico durante siete días, nos basamos en la metodología descrita por la Directriz 201 de la OECD (2011).

Se utilizaron tubos de doble cierre estériles de polipropileno (Sarstedt, AG & Co. Germany), estableciendo 12 réplicas por cada concentración ensayada y un control sin exponer al xenobiótico. Inicialmente, en cada tubo se incluyó una concentración de 10^6 cel

ml⁻¹ de *Scenedesmus intermedius* y aforo a 3 ml con medio de cultivo BG-11. Las células de la microalga *Scenedesmus intermedius* fueron obtenidas de cultivos madre, las cuales se mantuvieron en un cultivo axénico a 21 °C y periodos de luz-oscuridad de 12:12 h a una intensidad fotónica de 60 μmol m⁻² s⁻¹ en matraces de cultivo (Greiner; Bio-One; GmbH, Germany), con 20 mL de medio de cultivo BG-11 (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA). La concentración de la microalga *S. intermedius* para los bioensayos se ajustó por recuento sobre cámara de Neubauer (BlauBrand, GmbH + CO KG, Germany) en microscopio óptico (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). Los sets fueron expuestos a las concentraciones crecientes del xenobiótico. Los tubos control y los tubos expuestos a los plaguicidas se mantuvieron durante todo el ensayo a 21 °C y ciclos de luz-oscuridad de 12:12 h. Tras siete días de la exposición al xenobiótico se midió la biomasa celular en cámara de Neubauer (Figura 31).

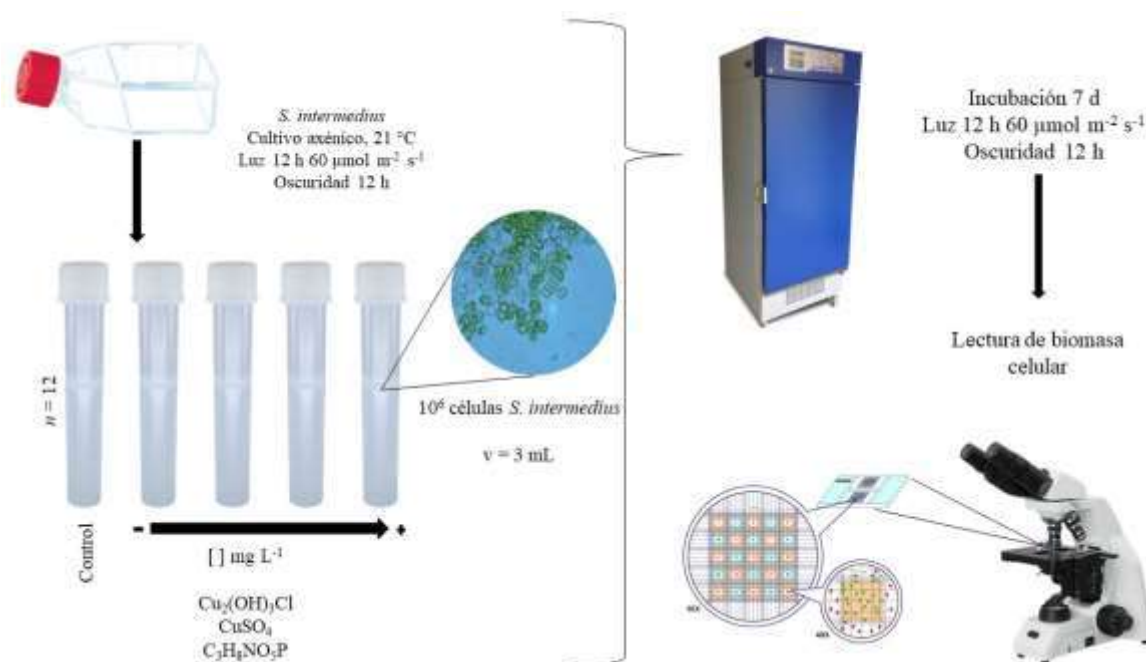


Figura 31. Diagrama del procedimiento descrito por la Directriz 201 de la OECD (2001) para la utilización de *S. intermedius* en pruebas de toxicidad aguda.

BIOENSAYO DE TOXICIDAD SOBRE *Vibrio fischeri* POR BIOLUMINISCENCIA

La sustancia de ensayo fue mezclada con solución de NaCl al 2 % hasta tener un pH en el rango de 6 a 8. Posteriormente, se realizaron una serie de diluciones con solución de NaCl al 2 % y se dispusieron en el Peltier como se muestra en la Tabla 7. Una vez realizadas las diluciones, se permitió la incubación de la muestra durante 15 minutos. De cada uno de los estándares se realizó la medida por duplicado y, una vez que se midieron todos los tubos, el luminómetro dio los valores de la concentración efectiva media (CE_{50}) y la curva de inhibición de luz (Figura 32). Para comprobar la validez de los resultados, se empleó un patrón de $ZnSO_4$ cuyo valor de CE_{50} es conocido.

Tabla 7. Disposición de las muestras en al Peltier.

	I	II	III	IV	V	VI
Hilera A	Blanco	1/16	1/8	1/4	1/2	Muestra original
Hilera B	100 μ L de bacterias + 100 μ L de blanco	100 μ L de bacterias + 100 μ L de muestra 1/16	100 μ L de bacterias + 100 μ L de muestra 1/8	100 μ L de bacterias + 100 μ L de muestra 1/4	100 μ L de bacterias + 100 μ L de muestra 1/2	100 μ L de bacterias + 100 μ L de muestra sin diluir

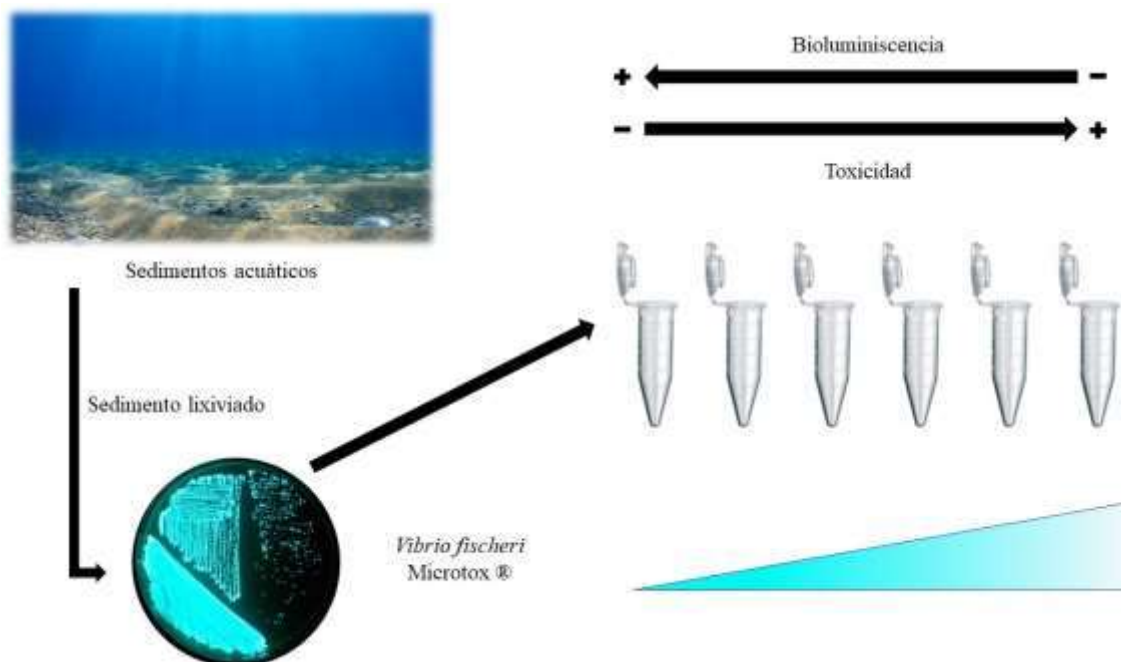


Figura 32. Diagrama del procedimiento base para la obtención de *V. fischeri* e interpretación de la toxicidad de un xenobiótico a partir de los cambios en la intensidad de bioluminiscencia.

ÍNDICE DE COMBINACIÓN

Se determinó el efecto de la combinación de los plaguicidas Oxicloruro de cobre, Sulfato de cobre y Glifosato sobre la microalga verde *S. intermedius* y el microcrustáceo *A. franciscana*, a través del ensayo descrito por Chou & Talalay (1984), para determinar el efecto sinérgico, aditivo o antagónico que puede presentar la combinación de dos o más sustancias químicas acorde con su Concentración Inhibitoria media (CI_{50}). Dicho efecto (sinérgico, aditivo o antagónico) es interpretado de acuerdo con el Índice de Combinación (IC) donde, cuando $IC < 1$ las sustancias químicas combinadas presentan mecanismos de acción similares o son mutuamente excluyentes, lo que indica un efecto sinérgico; por otro lado, si dos sustancias presentan mecanismos distintos y son independientes uno del otro, presentan un $IC > 1$ o bien, un efecto antagónico; cuando $IC = 1$ se habla de un efecto aditivo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de la CL_{50} , CI_{50} y NOEC serán obtenidos por regresión lineal a través de la relación de Concentración-Respuesta. La prueba de distribución normal de los datos se realizará a través de la prueba D'Agostino-Pearson por el sistema estadístico Graphpad Prism v7.0 (Graph-Pad Software Inc., USA) basada en la prueba de normalidad por D'Agostino y Pearson, (1973). La curva de inhibición de luminiscencia será obtenida a través de los valores de la CE_{50} obtenidos de los datos dados por el luminómetro.

La respuesta de sinergismo, antagonismo o adición en mezcla binaria $Cu_2(OH)_3Cl/Gli$ y $CuSO_4/Gli$ se obtuvo por el sistema de algoritmos a través de la relación Fracción afectada (Fa)-Índice de Combinación por medio del programa Compusyn v1.0 (ComboSyn Inc., Paramus, NJ. EE. UU.) (Chou & Martin, 2005).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

RESULTADOS

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) propone un sistema de categorización de sustancias o contaminantes en ambientes acuáticos en pruebas de toxicidad aguda (CL_{50} o CI_{50} expresado en $mg L^{-1}$). Dicha categorización segmenta a las sustancias de ensayo en cuatro categorías tal y como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Categorización de sustancias de acuerdo con el índice de toxicidad expresado en $mg L^{-1}$. (EPA, 1996).

Toxicidad aguda en $mg L^{-1}$	Categoría
≤ 1	I: Sustancias muy tóxicas para el ambiente acuático.
1 – 10	II: Sustancias tóxicas para el ambiente acuático.
10 – 100	III: Sustancias peligrosas para el ambiente acuático.
≥ 100	IV: Sustancias consideradas no tóxicas.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DEL $Cu_2(OH)_3Cl$ SOBRE *Scenedesmus intermedius*

Se obtuvo una $CI_{50(7d)}$ del fungicida oxiclورو de cobre de $40.86 mg L^{-1}$ (27.15-61.50) y una 7d-NOEC de $6.40 mg L^{-1}$ (4.72-8.13) sobre *Scenedesmus intermedius* tras siete días de exposición (Tabla 9), lo que lo incluye dentro de la Categoría III como una sustancia peligrosa para el ambiente acuático de acuerdo con la clasificación propuesta por la EPA para la categorización de los contaminantes acuáticos por toxicidad aguda.

Tabla 9. Valores de la CI_{50} y NOEC del $Cu_2(OH)_3Cl$ sobre *S. intermedius* tras siete días de exposición.

Índice de toxicidad	$mg L^{-1}$ (L. C. al 95 %)
7d-NOEC	6.39 (4.72 – 8.13)
$CI_{50(7d)}$	27.10 (25.12 – 29.17)

El efecto de la exposición aguda de *Scenedesmus intermedius* con el fungicida oxiclورو de cobre resultó en una respuesta peligrosa sobre la microalga, observados en la Figura 33, en donde a mayor concentración del herbicida mayor es la respuesta tóxica.

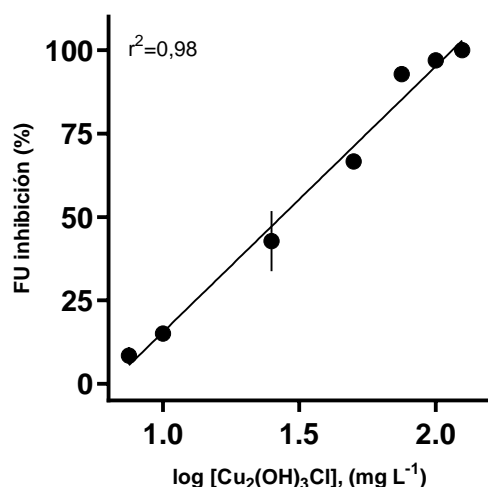


Figura 33. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de *S. intermedius* con el fungicida Cu₂(OH)₃Cl.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DEL CuSO₄ SOBRE *Scenedesmus intermedius*

Se obtuvo una CI_{50(7d)} del alguicida sulfato de cobre de 2.86 mg L⁻¹ (2.55 – 3.19) y una 7d-NOEC de 0.27 mg L⁻¹ (0.18 – 0.36) sobre *Scenedesmus intermedius* tras siete días de exposición (Tabla 10), lo que lo incluye dentro de la Categoría II como una sustancia tóxica para el ambiente acuático de acuerdo con la clasificación propuesta por la EPA para la categorización de los contaminantes acuáticos por toxicidad aguda.

Tabla 10. Valores de la CI₅₀ y NOEC del CuSO₄ sobre *S. intermedius* tras siete días de exposición.

Índice de toxicidad	mg L ⁻¹ (L. C. al 95 %)
7d-NOEC	0.27 (0.18 – 0.36)
CI _{50(7d)}	2.86 (2.55 – 3.19)

El efecto de la exposición aguda de *Scenedesmus intermedius* con el alguicida sulfato de cobre resultó en una respuesta muy tóxica sobre la microalga, observado en la Figura 34, en donde a mayor concentración del herbicida mayor es la respuesta tóxica.

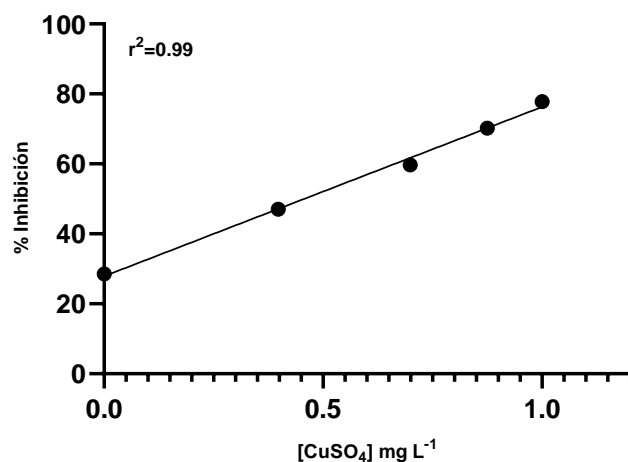


Figura 34. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de *S. intermedius* con el fungicida y alguicida CuSO₄.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DEL C₃H₈NO₅P SOBRE *Scenedesmus intermedius*

Se obtuvo una CI_{50(7d)} del herbicida glifosato de 4.28 mg L⁻¹ (3.41 – 5.46) y una 7d-NOEC de 0.43 mg L⁻¹ (0.18 – 0.72) sobre *Scenedesmus intermedius* tras siete días de exposición (Tabla 11), lo que lo incluye dentro de la Categoría II como una sustancia tóxica para el ambiente acuático de acuerdo con la clasificación propuesta por la EPA para la categorización de los contaminantes acuáticos por toxicidad aguda.

Tabla 11. Valores de la CI₅₀ y NOEC del C₃H₈NO₅P sobre *S. intermedius* tras siete días de exposición.

Índice de toxicidad	mg L ⁻¹ (L. C. al 95 %)
7d-NOEC	0.43 (0.18 – 0.72)
CI _{50(7d)}	4.28 (3.41 – 5.46)

El efecto de la exposición aguda de *Scenedesmus intermedius* con el herbicida glifosato resultó en una respuesta altamente tóxica sobre la microalga, observados en la Figura 35, en donde a mayor concentración del herbicida mayor es la respuesta tóxica.

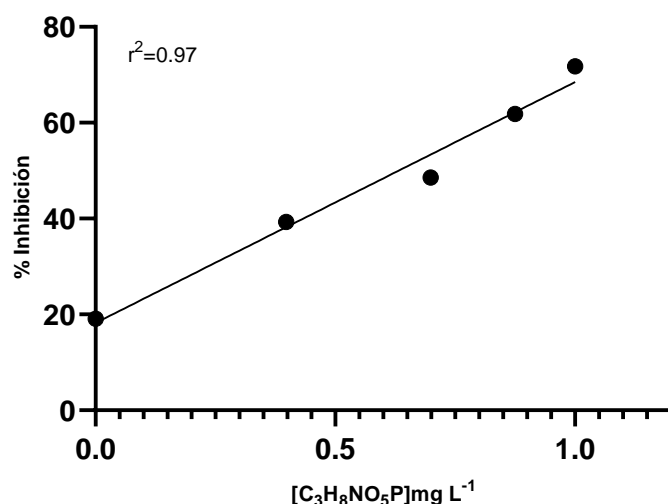


Figura 35. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de *S. intermedius* con el herbicida C₃H₈NO₅P.

COMPARACIÓN DE LOS ÍNDICES DE TOXICIDAD DEL Cu₂(OH)₃Cl, CuSO₄ Y C₃H₈NO₅P SOBRE *Scenedesmus intermedius*

Tabla 12. Comparación de los índices de toxicidad del Cu₂(OH)₃Cl, CuSO₄ y C₃H₈NO₅P sobre *S. intermedius* tras siete días de exposición.

Compuesto	Índice de toxicidad	mg L ⁻¹ (L. C. 95 %)
Cu ₂ (OH) ₃ Cl	CI _{50(7d)}	27.10 (25.12 – 29.17) ***
	7d-NOEC	6.40 (4.72 – 8.13)
CuSO ₄	CI _{50(7d)}	2.86 (2.55 – 3.19) ***
	7d-NOEC	0.27 (0.18 – 0.36)
C ₃ H ₈ NO ₅ P	CI _{50(7d)}	4.28 (3.41 – 5.46) ***
	7d-NOEC	0.43 (0.18 – 0.72)

***: $p < 0.0001$ diferencias estadísticamente muy significativas (ANOVA de una vía Post hoc Prueba de Tukey).

Estadísticamente existen diferencias muy significativas entre las CI_{50} de los tres agroquímicos (oxicloruro de cobre, sulfato de cobre y glifosato). Dichas CI_{50} para el sulfato de cobre y glifosato, se encuentran en la categoría II de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US-EPA), por encontrarse dichas concentraciones entre 1 y 10 $mg L^{-1}$, lo cual los estandariza como sustancias tóxicas para el ambiente acuático. Sin embargo, el sulfato de cobre presentó una toxicidad mayor sobre *Scenedesmus intermedius* en comparación con el glifosato y el oxicloruro de cobre, donde este último fue el menos tóxico, además por su CI_{50} , se le clasifica en la categoría III como sustancia peligrosa para ambientes acuáticos. Dicha relación se presenta en la Figura 36.

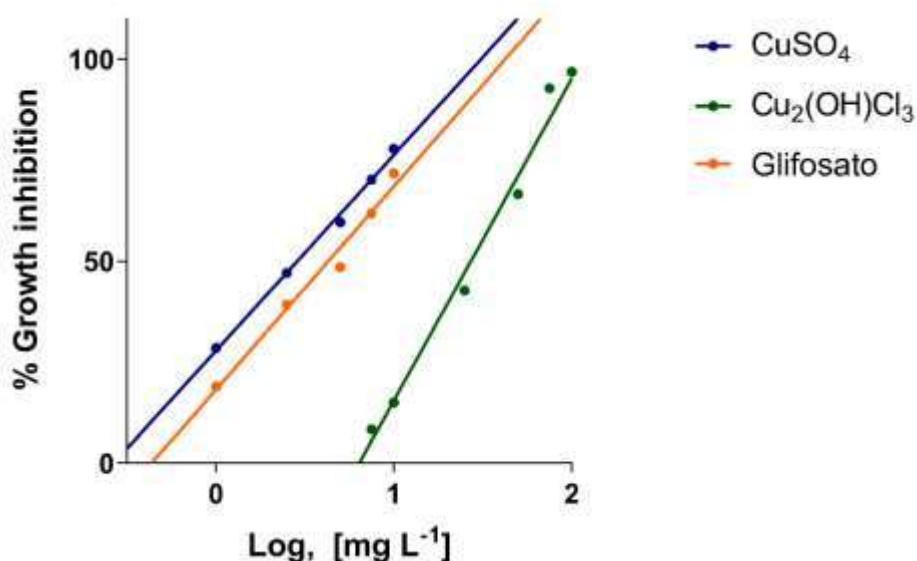


Figura 36. Comparación de los índices de toxicidad del $Cu_2(OH)_3Cl$, $CuSO_4$ y $C_3H_8NO_5P$ sobre *S. intermedius*.

DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD DEL $Cu_2(OH)_3Cl$ SOBRE *Artemia franciscana*

Se obtuvo una $CL_{50(24)}$ del fungicida oxicloruro de cobre de 76.21 $mg L^{-1}$ (60.81-94.41) y una 24h-NOEC de 4.83 $mg L^{-1}$ (1.57-9.20) sobre *Artemia franciscana* tras 24 de exposición (Tabla 13), lo que lo incluye dentro de la Categoría III como una sustancia peligrosa para el ambiente acuático de acuerdo con la clasificación propuesta por la EPA para la categorización de los contaminantes acuáticos por toxicidad aguda.

Tabla 13. Valores de la CL_{50} y NOEC del $Cu_2(OH)_3Cl$ sobre *A. franciscana* tras siete días de exposición.

Índice de toxicidad	mg L ⁻¹ (L. C. al 95 %)
24h-NOEC	4.83 (1.57 – 9.20)
$CL_{50(24)}$	76.21 (60.81 – 94.41)

El efecto de la exposición aguda de *Artemia franciscana* con el fungicida oxiclورو de cobre resultó en una respuesta tóxica sobre los nauplios de *Artemia*, observados en la Figura 37, en donde a mayor concentración del herbicida mayor es la respuesta tóxica.

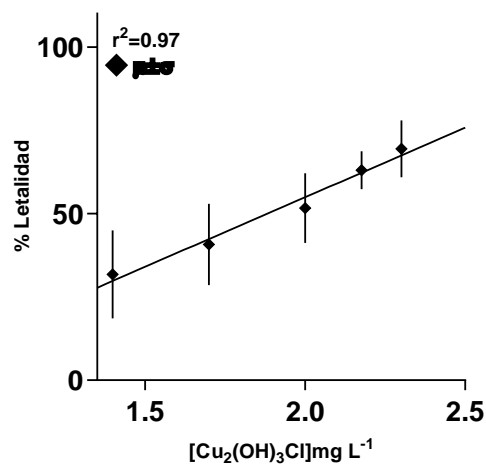


Figura 37. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de *A. franciscana* con el fungicida $Cu_2(OH)_3Cl$.

DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD DEL $CuSO_4$ SOBRE *Artemia franciscana*

Para el sulfato de cobre se observó una toxicidad elevada en bajas concentraciones con respecto a su respuesta de concentración letal media a 24 h de 34.04 mg L⁻¹ (Tabla 14). Por consiguiente, la exposición a nauplios de *A. franciscana* puede clasificarse dentro de categoría III, es decir, en sustancias peligrosas para el ambiente acuático.

Tabla 14. Valores de la CL_{50} y NOEC del $CuSO_4$ sobre *A. franciscana* tras siete días de exposición.

Índice de toxicidad	mg L ⁻¹ (L. C. al 95 %)
24h-NOEC	4.00 (0.46 – 9.01)
$CL_{50(24)}$	34.04 (20.56 – 51.76)

El resultado obtenido del sulfato de cobre en su CL_{50} sobre *Artemia*, resulta incluido al igual que el oxiclورو dentro de la categoría III de la EPA para toxicidad aguda en ambientes acuáticos, sin embargo, se observa una menor concentración para producir este efecto tóxico (Figura 38) que corrobora la mayor toxicidad de este compuesto.

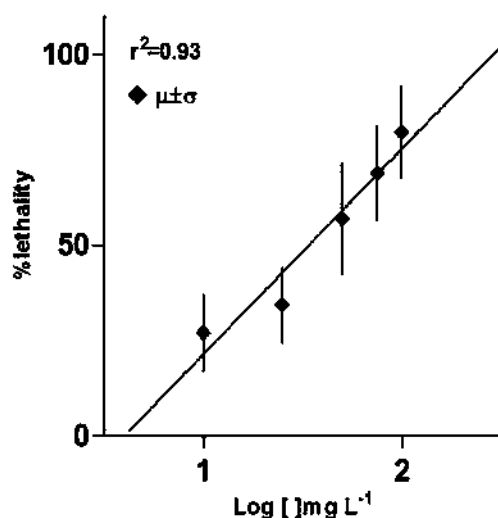


Figura 38. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de *A. franciscana* con el fungicida y alguicida $CuSO_4$.

DETERMINACIÓN DE LA MORTALIDAD DEL $C_3H_8NO_5P$ SOBRE *Artemia franciscana*

Se obtuvo una $CL_{50(24)}$ del herbicida glifosato de 0.31 mg L^{-1} ($0.30 - 0.32$) y una 24h-NOEC de 0.25 mg L^{-1} ($0.24 - 0.26$) sobre *Artemia franciscana* tras 24 de exposición, lo que lo incluye dentro de la Categoría I como una sustancia muy tóxica para el ambiente acuático

de acuerdo con la clasificación propuesta por la EPA para la categorización de los contaminantes acuáticos por toxicidad aguda tal como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Valores de la CL_{50} y NOEC del $C_3H_8NO_5P$ sobre *A. franciscana* tras siete días de exposición.

Índice de toxicidad	mg L ⁻¹ (L. C. al 95 %)
24h-NOEC	0.25 (0.24 – 0.26)
$CL_{50(24)}$	0.31 (0.30 – 0.32)

El efecto de la exposición aguda de *Artemia franciscana* con el herbicida glifosato [N – (fosfometil) glicina] resultó en una potente respuesta tóxica sobre los nauplios de *Artemia*, observados en la Figura 39, en donde a mayor concentración del herbicida mayor es la respuesta tóxica.

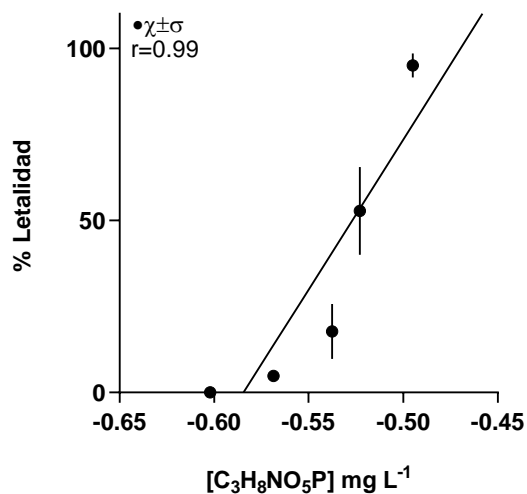


Figura 39. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de *A. franciscana* con el fungicida y alguicida $C_3H_8NO_5P$.

COMPARACIÓN DE LOS ÍNDICES DE TOXICIDAD DEL $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 Y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ SOBRE *Artemia franciscana*

Tabla 16. Comparación de los índices de toxicidad del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre *A. franciscana* tras 24 horas de exposición.

Compuesto	Índice de toxicidad	mg L ⁻¹ (L. C. 95 %)
$\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$	CL ₅₀₍₂₄₎	76.21 (60.81 – 94.41)
	24h-NOEC	4.83 (1.57 – 9.20)
CuSO_4	CL ₅₀₍₂₄₎	34.04 (20.56 – 51.76)
	24h-NOEC	4.00 (0.46 – 9.01)
$\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$	CL ₅₀₍₂₄₎	0.31 (0.29 – 0.32) ***
	24h-NOEC	0.20 (0.17 – 0.21) ***
***: $p = 0.0003$; $p < 0.05$ diferencias estadísticamente muy significativas (ANOVA de una vía Post hoc Prueba de Tukey).		

Estadísticamente existe una diferencia muy significativa entre el glifosato y los fungicidas basados en cobre (oxicloruro de cobre y sulfato de cobre), donde el glifosato, de acuerdo con la CL₅₀ obtenida, se clasifica en la categoría I de la US-EPA como sustancia muy tóxica para el ambiente acuático, mientras que las CL₅₀ obtenidas para el sulfato de cobre y el oxicluro de cobre se clasifican en la categoría III (sustancias peligrosas para el ambiente acuático). De estos dos compuestos basados en cobre, el sulfato de cobre es más tóxico que el oxicluro de cobre. Esto se muestra en la Figura 40.

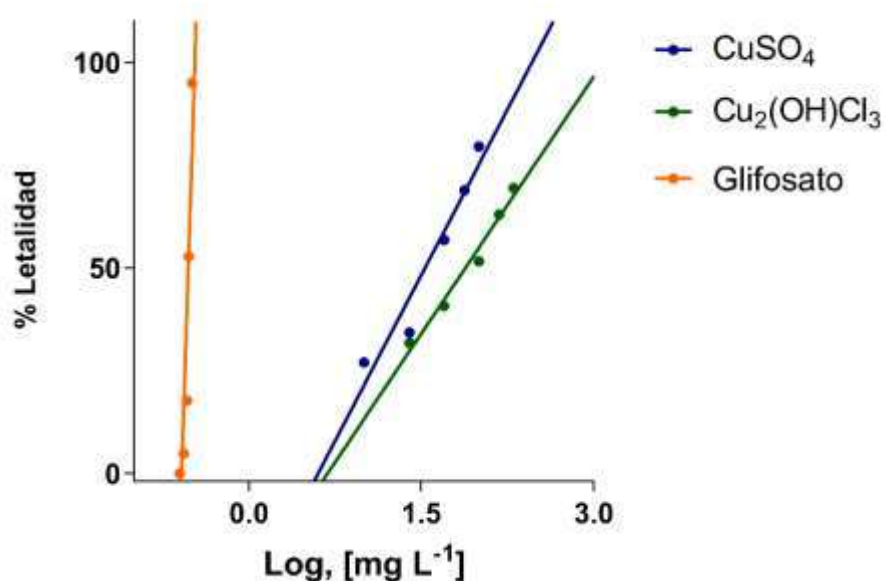


Figura 40. Comparación de los índices de toxicidad del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre *A. franciscana*.

EFFECTO DE LAS COMBINACIONES DE LOS PLAGUICIDAS $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 Y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ SOBRE *Scenedesmus intermedius*

El IC obtenido de las mezclas de $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre *S. intermedius*, se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Índice de Combinación (IC) de la Fracción afectada (Fa) para los combos $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre *S. intermedius*.

%Fa	IC $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$	IC $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$
10	0.63	6.38
25	0.23	4.74
50	0.09	3.53
75	0.38	2.63
95	0.01	1.61

La mezcla binaria de Oxiclورو de cobre/Glifosato inicia en un bajo sinergismo ($\text{IC} > 1$), cercano a un efecto aditivo y, dicho sinergismo, se intensifica a concentraciones altas

de ambos plaguicidas. Mientras tanto, la mezcla de Sulfato de cobre/Glifosato inicia en un efecto antagónico y disminuye su efecto al aumentar las concentraciones finalizando en un bajo antagonismo cercano al efecto aditivo. Dichos efectos se muestran en la Figura 41.

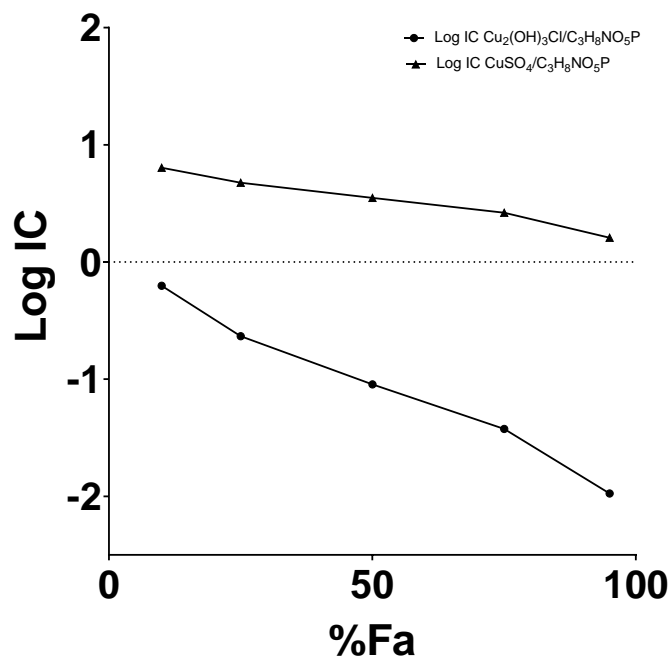


Figura 41. Relación de la Fracción afectada (Fa) – Índice de Combinación (IC) de las mezclas de $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre *S. intermedius*.

La respuesta lineal de forma individual de los plaguicidas $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y las combinaciones $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ tras siete días de exposición sobre la microalga verde *S. intermedius*, se muestran en la Figura 42, así como las CI_{50} expresadas en mg L^{-1} se encuentran en la Tabla 18.

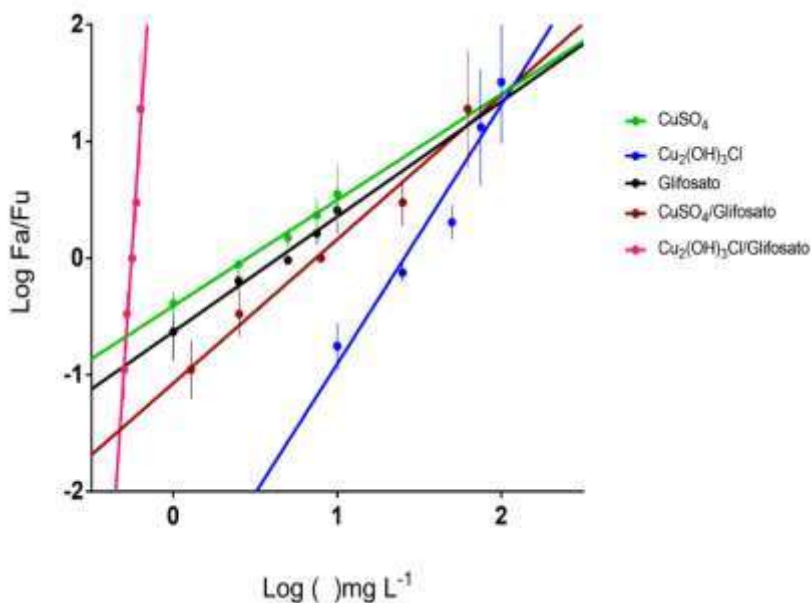


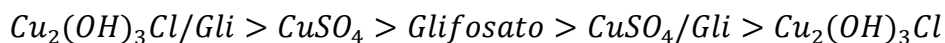
Figura 42. Respuesta lineal individual del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$, y las mezclas de $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre *S. intermedius*.

Tabla 18. Valores de las CI_{50} y 7d-NOEC de los plaguicidas y sus combinaciones sobre la microalga verde *Scenedesmus intermedius*.

Compuesto / Mezcla	CI_{50} (L. C. 95 %) (mg L^{-1})	7d-NOEC
CuSO_4	2.86 (2.54-3.20)	0.27 (0.13-0.40)
$\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$	25.56 (14.06-37.24) ^{a*}	9.50 (2.63-16.41)
$\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$	4.35 (3.65-5.41)	0.47 (0.23-0.74)
$\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$	7.83 (4.94-10.84) ^{b*}	1.24 (0.55-2.10)
$\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$	1.80 (1.76-1.84) ^{b*}	0.50 (0.48-0.51)
^{a*} : Diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$ de acuerdo con la prueba de Tukey (ANOVA de una vía) comparando CuSO_4 vs $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$.		
^{b*} : Diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$ de acuerdo con la prueba de Tukey (ANOVA de una vía) comparando $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ vs $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$.		

La respuesta del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ presenta el menor efecto tóxico sobre *S. intermedius* en comparación con las respuestas individuales de los plaguicidas $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y CuSO_4 , donde,

de manera individual, este último es quien presenta la respuesta tóxica mayor. A comparación de la mezcla $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$, la mezcla $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ es quien presenta el mayor efecto tóxico, no sólo de las combinaciones sino también de las respuestas tóxicas individuales. El orden de toxicidad entre las respuestas individuales y en combinación, de acuerdo con lo presentado en la Figura 42 y los datos de las CI_{50} de la Tabla 18 queda de la siguiente manera:



EFFECTO DE LAS COMBINACIONES DE LOS PLAGUICIDAS $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 Y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ SOBRE *Artemia franciscana*

Se determinó el efecto de la combinación de los plaguicidas $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre el microcrustáceo *A. franciscana*. El IC obtenido de las mezclas de $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre *A. franciscana*, se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19. Índice de Combinación (IC) de la Fracción afectada (Fa) para los combos $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre *A. franciscana*.

%Fa	IC $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{Glifosato}$	IC $\text{CuSO}_4/\text{Glifosato}$
10	1.10	1.10
25	1.03	1.04
50	1.02	1.03
75	1.04	1.04
95	2.00	1.07

La mezcla binaria de $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ inicia en un bajo antagonismo ($\text{IC} > 1$), cercano a un efecto aditivo y se intensifica levemente a concentraciones altas de ambos plaguicidas. Mientras tanto, la mezcla de $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ inicia en un efecto aditivo y se mantiene finalizando al aumentar las concentraciones de ambos plaguicidas. Dichos efectos se muestran en la Figura 43.

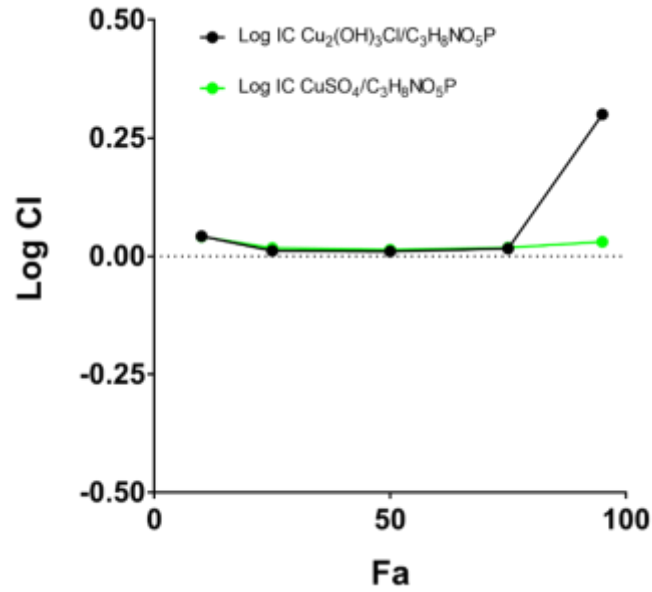


Figura 43. Relación de la Fracción afectada (Fa) – Índice de Combinación (IC) de las mezclas de $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre *A. franciscana*.

La respuesta lineal de forma individual de los plaguicidas $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y las combinaciones $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ tras 24 horas de exposición sobre el microcrustáceo *A. franciscana*, se muestran en la Figura 44, así como las CL_{50} expresadas en mg L^{-1} se encuentran en la Tabla 20.

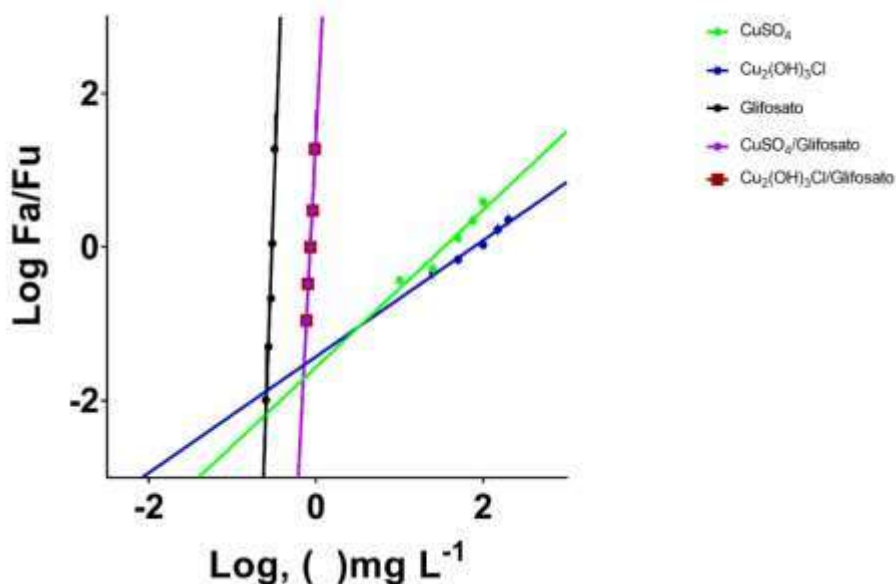


Figura 44. Respuesta lineal individual del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$, CuSO_4 y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$, y las mezclas de $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ sobre *A. franciscana*.

Tabla 20. Valores de las CL_{50} y 24h-NOEC de los plaguicidas y sus combinaciones sobre el microcrustáceo *A. franciscana*.

Compuesto / Mezcla	CL_{50} (L. C. 95 %) (mg L^{-1})	24h-NOEC
CuSO_4	34.04 (19.82-51.76)	3.96 (0.40-9.08)
$\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$	76.21 (60.81-94.41) *	4.23 (1.31-8.29)
Glifosato	0.29 (0.28-0.31)	0.25 (0.23-0.27)
$\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$	0.85 (0.83-0.87)	0.77 (0.74-0.79)
$\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$	0.86 (0.84-0.87)	0.77 (0.74-0.79)

*: Diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$ de acuerdo con la prueba de Tukey (ANOVA de una vía) comparando CuSO_4 vs $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$.

La respuesta del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ presenta el menor efecto tóxico sobre *A. franciscana* en comparación con las respuestas individuales de los plaguicidas CuSO_4 y $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$, donde, de manera individual, este último es quien presenta la respuesta tóxica mayor. A comparación

entre la mezcla $\text{CuSO}_4/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ y la mezcla $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ ambas presentan respuestas tóxicas cercanas, es decir, no hay diferencia estadísticamente significativa. El orden de toxicidad entre las respuestas individuales y en combinación, de acuerdo con lo presentado en la Figura 44 y los datos de las CL_{50} de la Tabla 20 queda de la siguiente manera:

$$\text{Glifosato} > \text{CuSO}_4/\text{Gli} \approx \text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}/\text{Gli} > \text{CuSO}_4 > \text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$$

BIOENSAYO DE TOXICIDAD POR DISMINUCIÓN DE LA BIOLUMINISCENCIA DE LA BACTERIA MARINA *Vibrio fischeri*

Se determinó el efecto del fungicida oxiclورو de cobre utilizando el método de disminución de bioluminiscencia por medición por luminómetro en presencia de un xenobiótico utilizando como bioindicador a la bacteria marina *Vibrio fischeri*. Se obtuvo una CE_{50} de 12.68 mg L^{-1} (5.93-27.13) y una NOEC de 3.41 mg L^{-1} (0.22-0.73) (Tabla 21), lo que lo incluye dentro de la categoría III de la US-EPA, como sustancia peligrosa para el ambiente acuático.

Tabla 21. Valores de la CE_{50} y NOEC del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ sobre la bacteria marina *V. fischeri*, por exposición aguda.

Índice de toxicidad	mg L^{-1} (L. C. al 95 %)
NOEC	3.41 (5.93 – 27.13)
CE_{50}	12.68 (5.93 – 27.13)

El efecto del oxiclورو de cobre sobre la bioluminiscencia de la bacteria marina *Vibrio fischeri*, resultó en una respuesta altamente tóxica como se muestra en la Figura 45, en donde a mayor concentración del xenobiótico menor la cantidad de bioluminiscencia emitida por la bacteria.

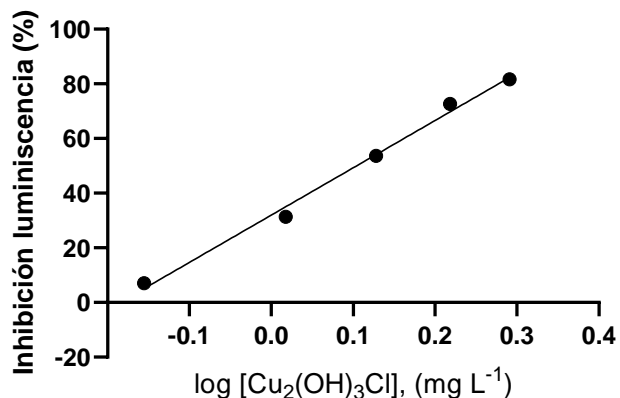


Figura 45. Respuesta del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ sobre la bioluminiscencia de la bacteria marina *V. fischeri*.

DISCUSIÓN

La degradación de los recursos acuáticos ha sido motivo de preocupación para la humanidad de los últimos tiempos. Los primeros esfuerzos para determinar el daño ecológico causado por residuos domésticos e industriales en las corrientes de agua fueron realizados por Kokwitz & Marson (1902, 1908, 1909), pero no fue sino hasta mediados de los años 50 del siglo XX, cuando comenzaron a utilizarse diferentes metodologías de evaluación de la calidad del agua mediante el uso de indicadores biológicos. Patrick (1949, 1950), propuso métodos biológicos para evaluar las condiciones ecológicas de las corrientes de agua. En pleno siglo XXI uno de los problemas ambientales es también el de los efectos negativos derivados del uso inadecuado de agroquímicos, por lo que evaluar los posibles efectos adversos que causan sobre el medio ambiente es indispensable para ayudar a la regulación de éstos. Reforzando esta idea, Iannacone & Alvariño (2011), mencionan que la investigación del efecto ecotoxicológico proporciona más solidez a la evaluación de la calidad del agua, ayudando a que se establezcan mejores criterios de calidad para la protección de la vida acuática, de este modo la evaluación de riesgos se perfila, según Torres (2008), como una herramienta que puede utilizarse para estimar y jerarquizar la importancia ambiental de una medida, calculando cuantitativamente y/o cualitativamente, los daños a los ecosistemas derivados de la exposición a un contaminante ambiental. Por su parte Vassiliou (2016), en un estudio, advierte la importancia de, además de los factores de exposición, toxicidad y las características del ecosistema, incluir los que afectan la fuente, el patrón de aplicación, la

carga y la disponibilidad de plaguicidas, para la evaluación del riesgo de los plaguicidas en cuerpos de agua.

El uso del cobre en la agricultura está muy extendido, tanto a nivel fitosanitario como a nivel fertilizante. Los fungicidas a base de cobre trabajan liberando pequeñas cantidades de iones Cu^{+2} cuando entran en contacto con el agua. Ossana (2011), manifiesta que el cobre es un metal pesado comúnmente encontrado en los ecosistemas acuáticos, debido a su amplia y diversa utilización. Además, recalca que, a pesar de ser un metal esencial en las plantas y los animales, en concentraciones elevadas ejercen una amplia gama de efectos adversos en los organismos acuáticos. Existen 3 sales comerciales de cobre de tipo agrícola:

- Óxidos (p. ej. hidróxidos, óxidos, cobres rojos), presentan una alta solubilidad y un potencial de ionización alto.
- Sulfatos (p. ej. caldo bordelés), tienen una solubilidad y potencial de ionización medio.
- Oxiclорuros, presentan baja solubilidad y un potencial de ionización alto.

El oxiclорuro tiene la solubilidad más baja, por lo que el cobre se va liberando más lentamente (y por lo tanto actúa más tiempo) y presenta un potencial de ionización alto (indica que tiene más cantidad de ion cobre, que es la parte que tiene la acción fungicida e inhibe la germinación de la espora). Los sulfatos tienen la ventaja de que la disponibilidad de cobre es más rápida, pero su efecto es muy corto, tienen menor potencial de ionización por eso sus dosis suelen ser más altas.

Los óxidos liberan muy rápido el cobre y tienen un elevado potencial de ionización y por ello puede provocar fitotoxicidad por cambios de T° . Por lo tanto, el oxiclорuro es más eficaz y persistente en el tiempo. Dentro de los Oxiclорuros también hay diferencias sobre todo por su tamaño de partícula. Cuanto más pequeño mejor pues recubren más y suelen aguantar más el lavado por lluvia. También al ser la partícula más pequeña el riesgo de fitotoxicidad es menor. Se suelen formular con compuestos orgánicos (Mancoceb, propineb, metaram...) pues reaccionan con ellos y prolongan su eficacia (la del orgánico) de 2-3 días pueden pasar a 7-10 días.

Por contra otro argumento contra el Caldo Bordelés, primer compuesto derivado cúprico empleado en el tiempo, es que este al ser formulado con cal, tapa las estomas de la planta y no la deja respirar por asfixia (Thomson, 2000).

Los fungicidas cúpricos actúan por contacto y de forma preventiva, formando una barrera protectora en la superficie de las hojas contra el ataque de los hongos endoparásitos. Los iones son absorbidos por las esporas del hongo y las bacterias hasta que la acumulación resulta letal para sus células. El Cobre (II) ejerce una acción múltiple en las células de los hongos: Bloqueo del proceso respiratorio, inhibición de la síntesis de proteínas y reducción de la actividad de la membrana celular. Esta acción multisitio se ejerce en distintos procesos controlados por distintos genes, de tal modo que la aparición del fenómeno de la resistencia será muy improbable. (Latorre,1989).

De los resultados obtenidos en este estudio teniendo una $CI_{50(7d)}$ de 40.86 mg L^{-1} , podemos comparar con un trabajo realizado por el Instituto Regional de Estudios de Sustancias Tóxicas (IRET) de Costa Rica donde, sobre la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* también conocida como *Raphidocelis subcapitata* o *Selenastrum capricornutum*, en un estudio a 72 h, obtuvieron una CI_{50} de 0.33 mg L^{-1} lo que coloca al oxiclورو de cobre como muy tóxico para organismos acuáticos, además de poder clasificarlo en la categoría I de la US-EPA, entendiendo que Categoría I > Categoría III en términos de toxicidad.

Por otra parte, un estudio realizado por Knauer, 2013 sobre *Scenedesmus subspicatus* a la exposición del oxiclورو de cobre a las 72h, obtuvo una CI_{50} de $52.30 \text{ mg Cu L}^{-1}$, que de acuerdo el valor de CI_{50} en nuestro estudio al convertirlo en equivalentes en mg de Cu por Kg de la sal ($CI_{50} 20.43 \text{ mg Cu L}^{-1}$), es menor la concentración necesitada para la inhibición de fluorescencia de la microalga, y por ende de su tasa de crecimiento (ECHA, 2013). Esto puede deberse al tiempo de exposición ya que, a pesar de ser pruebas de toxicidad aguda, el tiempo de exposición varía en función del ciclo biológico del bioindicador, sin embargo, aunque existe diferencia en las CI_{50} para ambos bioindicadores, ambos son agrupables en la categoría III de la US-EPA como sustancias peligrosas para el ambiente acuático.

Así mismo, otros autores han realizado estudios de la toxicidad del plaguicida oxiclورو de cobre sobre diversos organismos.

Tabla 22. Concentración o Efecto letal medio (CL₅₀ o CE₅₀) del Cu₂(OH)₃Cl sobre organismos acuáticos.

Orden	Organismo	Tiempo de exposición	CL ₅₀ /CE ₅₀ (mg L ⁻¹)	Referencia
Cypriniformes	<i>Danio rerio</i>	96 h	0.152	Cyrino <i>et al.</i> (2004)
Cypriniformes	<i>Cyprinus carpio</i>	96 h	0.20	Grădilă (2015)
Pulmonata	<i>Biomphalaria glabrata</i>	48 h	1.433	Cyrino <i>et al.</i> (2004)
Anura	<i>Rana catesbeiana</i>	96 h	2.4	Ferreira <i>et al.</i> (2004)
Anura	<i>Rana catesbeiana</i>	96 h	2.8	Fryday & Thompson (2012)
Decapoda	<i>Cryphiops caementarius</i>	96 h	2607.72	Paredes & Anaya (2015)
Cladocea	<i>Daphnia magna</i>	48 h	0.29	Lewis <i>et al.</i> (2016)
Cladocea	<i>Daphnia magna</i>	48 h	0.10	Grădilă (2015)
Cladocea	<i>Daphnia similis</i>	48 h	0.065	Cyrino <i>et al.</i> (2004)

De acuerdo con la Evaluación voluntaria de riesgo de compuestos del cobre de la Unión Europea (en inglés EU Voluntary risk assessment of Copper compounds) (ECHA, 2013), en un ensayo sobre *Chlorella vulgaris*, en un estudio crónico en pH de 5.5 a 8.5 obtuvieron una NOEC de 0.09 mg L⁻¹ y, sobre *Raphidocelis subcapitata* al mismo rango de pH y en un estudio crónico, una NOEC de 0.04 mg L⁻¹, lo que es significativamente menor que lo obtenido en este estudio (NOEC 6.4 mg L⁻¹), es decir, se requiere menor cantidad de oxiclورو de cobre para poder provocar efectos de toxicidad, esto contrasta con lo dicho por la NOM-127-SSA1-1994 que indica como límite máximo permisible en agua para consumo humano hasta 2.0 mg L⁻¹ de cobre. En el estudio realizado por De Oliveira-Filho *et al.*, (2004) donde compararon la toxicidad de diferentes pesticidas a base de cobre sobre el pez cebra *Danio rerio* se encontró una LC₅₀ de 0.349 mg/l, este organismo al igual que las hidras es

más sensible que *A. franciscana*. Para crustáceos de agua dulce se reportó una LC₅₀ de 0.380 mg L⁻¹ para *M. lamarrei* y 1.643 mg L⁻¹ en *M. dayanum* (Lodhi *et al.*, 2004).

En la Tabla 23 podemos observar una recopilación de las CL₅₀ a 24h de exposición del cobre en diferentes organismos acuáticos (hidras, peces, algas y crustáceos) obtenidas de diferentes estudios realizados sobre la toxicidad aguda del cobre.

Tabla 23. Toxicidad del cobre y compuestos basados en cobre sobre diferentes especies marinas.

Forma del cobre utilizada	Especies	CL ₅₀ (mg L ⁻¹)	Referencias
Cu	<i>H. vulgaris</i>	0.140	Karntanut & Pascoe (2002)
Cu	<i>H. oligactis</i>	0.180	Karntanut & Pascoe (2002)
CuSO ₄	<i>D. rerio</i>	0.349	De Oliveira-Filho <i>et al.</i> (2004)
CuSO ₄	<i>M. lamarrei</i>	0.380	Lodhi <i>et al.</i> (2004)
CuSO ₄	<i>M. dayanum</i>	1.634	Lodhi <i>et al.</i> (2004)
CuSO ₄	<i>Cryphiops caementarius</i>	3.875	Mendoza-Rodríguez (2009)
CuSO ₄	<i>Mysis sp. camarón</i>	4.86	Zyadah & Abdel-Baky (2000)
CuSO ₄	<i>M. cephalus</i>	6.3	Zyadah & Abdel-Baky (2000)
CuSO ₄	<i>Tetraselmis chuii</i>	6.44	Cordero <i>et al.</i> (2005)
CuSO ₄	<i>T. zillii</i>	9.2	Zyadah & Abdel-Baky (2000)
CuSO ₄	<i>A. franciscana</i>	34.04	Presente estudio

CuCl ₂	<i>D. magna</i>	60	Gaete & Paredes (1996)
Cu	<i>Tilapia nilotica</i> Linn	73.40	Somsiri (1982)

Existe una numerosa cantidad de factores que tienen influencia sobre la respuesta de toxicidad de los metales en los organismos acuáticos. En primera instancia éstos pueden dividirse en factores de tipo fisicoquímicos y de tipo biológicos. Los primeros involucran a todos aquellos parámetros que afectan a la especiación química de los metales, con la presencia de otros metales y de otros contaminantes (plaguicidas, hidrocarburos del petróleo). Los factores biológicos que influyen o que tienen relación con los efectos de los metales están estrechamente vinculados con las condiciones propias de los organismos como son la edad, talla, peso, sexo, estadio, madurez gonádica, capacidad de adaptación, hábitos alimenticios, entre otros (Páez-Osuna, 2005). Por otro lado, la captación y toxicidad de los metales pesados sobre los organismos acuáticos están influidos no solo por su concentración, sino que también son relevantes el tiempo de exposición y los factores bióticos y abióticos del ambiente (Castañé *et al.*, 2003). Por ejemplo, Sprague (1995) comenta que los metales pesados son en un orden de magnitud más letales en aguas suaves que en las duras. Generalmente la dureza es correlacionada con la alcalinidad y pH por lo cual también estos intervienen sobre la especiación y biodisponibilidad. Además, la concentración salina influye sobre la biodisponibilidad y toxicidad de metales, en general la potencia de un contaminante ha sido inversamente relacionada a la cantidad de sales (Knezovich, 1994).

El cobre es uno de los metales más estudiados, sin embargo, existe muy poca información acerca de su toxicidad en organismos de agua salada, en la mayoría de los estudios que se encuentran en la literatura los bioindicadores son organismos acuáticos de agua dulce y por ende en el que se ha generado una mayor cantidad de información. Páez-Osuna (2005) comenta que existe una variabilidad de los resultados toxicológicos que se encuentran en la literatura, ya que la toxicidad del Cobre es atribuida principalmente al ion Cu (II), el cual puede llegar a forma complejos fácilmente con una gran variedad de sustancias que se hallan tanto en aguas limpias y contaminada, también es absorbido con cierta facilidad por el material suspendido (oxidihidroxilo de hierro y manganeso, minerales

arcillosos, materia orgánica, entre otros). Esta propiedad y las dificultades relacionadas con la separación de las especies químicas influyen y tiene que ver con la variabilidad de los resultados.

El valor de la CL_{50} para el sulfato de cobre (II) obtenido en un estudio realizado por Eslava (2011), fue de 34.04 mg L^{-1} en nauplios de *A. franciscana* a 24 horas de exposición. Sin embargo, al comparar con los resultados obtenidos por Velasco-Martínez (2016) el cual también trabajó con nauplios de *Artemia franciscana* existen diferencias considerables ya que su valor obtenido de la CL_{50} fue de 0.25 mg L^{-1} a 48 horas. En los resultados obtenidos en nuestro bioensayo, los resultados fueron CL_{50} de 34.04 mg L^{-1} sobre *A. franciscana* y CI_{50} de 2.86 mg L^{-1} sobre *S. intermedius*, la diferencia puede deberse al tiempo de exposición, así como a las concentraciones utilizadas en cada ensayo. Mientras que, al enfrentar a *Artemia franciscana* con el oxiclورو de cobre, se obtuvo una CL_{50} de 76.21 mg L^{-1} , un resultado menos tóxico que lo obtenido por los autores anteriores al utilizar sulfato de cobre como sustancia de ensayo.

Las concentraciones totales de metales en los suelos y aguas son malos predictores de toxicidad para los organismos que en ellos habitan, porque las características tanto del suelo como del agua y los ligandos complejantes influyen en gran medida en la biodisponibilidad del metal.

El herbicida glifosato, de amplia y dominante utilización en la agricultura está en la mira de la sociedad por preocupaciones para la salud, tanto del ambiente como humana. El glifosato es soluble en agua (11.6 g L^{-1} , $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) y tiene una baja presión de vapor ($7.5 \cdot 10^{-8} \text{ mmHg}$). Por tanto, posee un valor de constante de Henry bajo ($1.44 \cdot 10^{-12} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$), indicando que se distribuirá preferentemente en el compartimiento acuático. Su carácter anfótero hace que la molécula se encuentre cargada negativamente a pH neutro (pKa: 2; 2.6; 5.6; 10.6). Esto sumado a su bajo valor de Kow ($3.3 \cdot 10^{-4}$) indican que su biodisponibilidad en ambientes acuáticos y capacidad de acumulación se verá limitada, explicando los bajos factores de bioconcentración (BFC = 0.04) publicados. En agua, la persistencia del glifosato es baja con una vida media (DT_{50}) de 2.5 días (UN-ILO-WHO, 1994; Schuette, 1998; Giesy *et al.*, 2000). Algunas de las características podrían definir a esta sustancia como no tan

tóxica; sin embargo, en nuestro trabajo la evaluación toxicológica aguda tanto en *A. franciscana* ($CL_{50(24)}$ de 0.31 mg L^{-1}) como en *S. intermedius* ($CI_{50(7d)}$ 4.28 mg L^{-1}) lo encuadra dentro de la categoría I y II (US-EPA) como sustancia muy tóxica y peligrosa para los ambientes acuáticos.

Un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud sobre el bioindicador de agua dulce, el microcrustáceo *Daphnia magna*, tras 24h de exposición al glifosato obtuvieron una $CL_{50(24)}$ de 9.34 mg L^{-1} (WHO, 1994) que, según la clasificación de riesgos para el ambiente acuático de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA) y dada la CL_{50} obtenida, reclasifica al glifosato dentro de la categoría II como sustancia tóxica para el ambiente acuático (anteriormente categoría IV; WHO, 1994). Mientras tanto, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) mantuvo su declaratoria y clasificaba al glifosato en la categoría IV como sustancia no tóxica (COFEPRIS, 2016). Esto discrepa de los resultados de nuestro estudio ya que en los bioensayos de toxicidad aguda sobre zooplancton (*A. franciscana*) resultó en la categoría I como sustancia muy tóxica; en los del fitoplancton (*S. intermedius*) en la categoría II como sustancia tóxica peligrosa.

Debido al amplio uso del glifosato como se ha mencionado, este se presenta fácilmente en el medio ambiente, incluyendo suelos y aguas donde los metales pesados se encuentran con frecuencia en niveles elevados (Peterson *et al.*, 1994). Por lo tanto, la interacción entre estas sustancias (glifosato y metales) es de esperarse. En nuestro estudio, la toxicidad del Oxiclورو de cobre en combinación con el glifosato presenta una toxicidad mayor que la respuesta individual de ambos plaguicidas sobre la microalga verde *S. intermedius*. También, sobre *A. franciscana*, la combinación de Oxiclورو de cobre/Glifosato y Sulfato de cobre/Glifosato presentan una respuesta tóxica mayor que sus respuestas individuales. Lo anterior contrasta con lo descrito por Tsui *et al.* (2005), que descubrieron que la adición de glifosato podría reducir significativamente la toxicidad aguda del Cobre y otros metales pesados sobre *Ceriodaphnia dubia*. Lo anterior se basó en un estudio realizado por Zhou *et al.* (2012), donde observaron que la inhibición en el crecimiento y reproducción de *Eisenia fetida* mejoraba a medida que la absorción total de Cu se disminuía en presencia de glifosato. Además, los contenidos de SOD, CAT y MDA fueron restaurados

hasta cierto punto en presencia de Glifosato. La marcada disminución de la toxicidad y acumulación de Cu por el glifosato puede ser relacionado debido a la capacidad del glifosato para formar compuestos estables con el cobre. El modelo de actividad de iones libre implica que solo los iones libres se espera que sean tóxicos o biodisponibles. Debido a compleja capacidad de ionización con metales, el glifosato podría afectar la biodisponibilidad, toxicidad y bioacumulación de metales cuando es aplicado directamente en los ecosistemas que reciben ambos grupos químicos (Tsui *et al.*, 2005). Según María Elena Zaccagnini, Coordinadora Nacional del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), en el Área Estratégica de Gestión Ambiental (2010), en el caso específico del glifosato, otro de los problemas asociados es la simplificación del paisaje que tiene lugar como resultado de la desaparición de coberturas vegetales circundantes a los campos de cultivo, y que afectan el hábitat para la diversidad de las especies y los procesos ecológicos que estas desempeñan en el ecosistema. Por esta razón, no solo debemos considerar los aspectos toxicológicos asociados a los agroquímicos, sino todos los efectos secundarios que pueden resultar de sus aplicaciones, sobre todo, si estas ocurren a grandes escalas espaciales y con repetición en el tiempo.

Vibrio fischeri es una bacteria gram negativa, anaerobia facultativa, de la familia Vibrionaceae cuya característica más representativa es la bioluminiscencia. La reacción de bioluminiscencia bacteriana está ligada al sistema de transporte de electrones en la respiración celular y es indicativa del estado metabólico de la célula, de modo que una disminución de la bioluminiscencia indica la disminución de la respiración celular. Los contaminantes físicos, químicos y biológicos afectan a la respiración celular alterando el porcentaje de síntesis de proteínas y lípidos y modificando por tanto el nivel de emisión de luminiscencia. Si una muestra no presenta disminución en la emisión de luz a ninguna dilución, la muestra no se considera tóxica y no existe para ella valor de concentración efectiva media (CE₅₀).

En un estudio realizado por Hsieh *et al.* (2004) mostraron resultados realizados sobre diversos metales, su efecto sobre la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri* y el nivel de sensibilidad de la prueba, obteniendo una CE₅₀ de 7.08 mg L⁻¹ utilizando como xenobiótico una solución de nitrato de cobre [Cu(NO₃)₂].

En la actualidad existen diferentes sistemas de bioluminiscencia bacteriana en el mercado (Microtox ®, ToxAlert ® o Biotox ®) muy útiles para los ensayos preliminares de contaminantes en el medio ambiente (agua y suelo). Son sistemas sensibles a la mayoría de los compuestos tóxicos, que utilizan operaciones sencillas y cercanas al tiempo real (US-EPA, 2004). A pesar de su simplicidad, permiten hacerse una idea del impacto de los tóxicos en el medio ambiente de la muestra. Un ejemplo de estos sistemas es Microtox ® que utiliza la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri*. Pese a que tiene ciertas limitaciones para su uso en ambientes tropicales y subtropicales, debido a que su temperatura óptima es de 15 °C, ya que la luminiscencia se ve afectada a temperaturas superiores (Halmi *et al.*, 2014), ha sido ampliamente utilizado para probar metales pesados (Agnieszka *et al.*, 2014), hidrocarburos de petróleo (Heinlaan *et al.*, 2007) o pentaclorofenol (Mueller *et al.*, 1991).

La Tabla 24 presenta una lista con datos comparativos entre los valores de toxicidad aguda de CL₅₀ o CE₅₀ con el metal cobre en ocho bioindicadores acuáticos. Dichos ensayos de toxicidad muestran una correlación positiva entre el ensayo Microtox ® que utiliza la bioluminiscencia de *V. fischeri*.

Tabla 24. Toxicidad aguda del Cu sobre ocho bioindicadores marinos.

Organismo	Índice de toxicidad	Toxicidad (mg L ⁻¹)	Referencia
<i>Chironomus</i>	CL ₅₀	0.03	Iannacone & Dale (1999)
<i>Moina</i>	CL ₅₀	0.003	Iannacone & Dale (1999)
<i>Daphnia</i>	CL ₅₀	0.02	Munkittrick <i>et al.</i> (1991)
<i>Poecilia</i>	CL ₅₀	0.37	Iannacone & Alvarino (1996)
<i>Oncorhynchus</i>	CL ₅₀	0.25	Munkittrick <i>et al.</i> (1991)
<i>Vibrio</i>	CE ₅₀	0.24	Munkittrick <i>et al.</i> (1991)

<i>Brachionus</i>	CL ₅₀	0.06	Snell <i>et al.</i> (1991)
<i>Pseudomonas</i>	CE ₅₀	51.7	Codina <i>et al.</i> (1993)

La sensibilidad no es el único criterio usado para seleccionar un bioensayo. La facilidad de uso, costo y concordancia ecológica son otros parámetros que deben ser considerados (Crisinel *et al.*, 1994). El criterio de “facilidad de uso” incluye rapidez, simplicidad en la manipulación, así como en la lectura, disponibilidad del material biológico y volumen de muestra. Los ensayos con bacterias luminiscentes y con partículas submitocondriales son pruebas de más fácil lectura, pero con manipulación poco simple, en comparación con aquellas que emplean invertebrados como *Daphnia* o *Artemia*. La simplicidad de manipulación y lectura dependen esencialmente del tamaño de los organismos; a mayor tamaño, mejor será el método. Por otra parte, la disponibilidad de material biológico es una gran ventaja del uso de invertebrados, sin embargo, el ensayo con bacterias luminiscentes requiere de una buena provisión de la cepa bacteriana de *Vibrio fischeri*, por lo que el ensayo Microtox® necesita solo una pequeña cantidad de muestra, pudiendo ser esto una ventaja sobre los bioensayos con invertebrados.

La evaluación de la calidad del ambiente, en particular de las comunidades acuáticas, ha sido por tradición, desarrollada con base en métodos soportados por mediciones y determinaciones de las características físicas y químicas del agua, sin embargo, es importante incorporar mecanismos como los indicadores biológicos que complementen a los métodos tradicionales. Algunos métodos de uso muy extendido en estudios toxicológicos, como el bioensayo en ratón, no parecen ser la mejor solución ni ética ni económicamente, por lo que un sistema que englobe varios ensayos (bioluminiscencia, caracterización de especies, inmunodetección de toxinas, toxicidad aguda sobre un modelo de zooplankton, etcétera) optimizando el uso de cada uno de ellos, siempre será más fiable y completo que el uso de cada uno de ellos por separado.

CONCLUSIONES

Se concluye, por tanto, que las pruebas del bioensayo agudo con el microcrustáceo *A. franciscana* y el alga *Scenedesmus intermedius* son de importancia para determinar los efectos de sustancias potencialmente tóxicas al ambiente; a la vez nos muestran que se debe tomar en cuenta criterios biológicos al momento de analizar o caracterizar cuerpos de agua, especialmente cuando están presentes varias sustancias potencialmente contaminantes, condición importante que tienen los bioensayos en la visualización y abordaje de la problemática ambiental.

Los resultados del estudio demuestran que el oxiclорuro de cobre presenta toxicidad categoría III (US-EPA) como sustancia peligrosa para el ambiente acuático sobre los bioindicadores utilizados.

Ciertas particularidades comunes de los microcrustáceos, las algas y las bacterias tales como el tamaño, la morfología, bioluminiscencia, ciclo biológico y el rol ecológico, los tornan buenos indicadores de toxicidad y permiten evaluar eficientemente los efectos tóxicos de los metales.

En este estudio, en orden de sensibilidad al oxiclорuro de cobre, *Vibrio fischeri* fue el bioindicador más sensible, seguido de *Scenedesmus intermedius* y el más tolerante fue *Artemia franciscana*.

Se encontró que, según su toxicidad (individual y en mezcla), los plaguicidas pueden ser ordenados de la siguiente manera: $Cu_2(OH)_3Cl/Gli > CuSO_4 > Glifosato > CuSO_4/Gli > Cu_2(OH)_3Cl$, sobre *S. intermedius* y $Glifosato > CuSO_4/Gli \approx Cu_2(OH)_3Cl/Gli > CuSO_4 > Cu_2(OH)_3Cl$ sobre *A. franciscana*.

En las relaciones aditividad-sinergismo-antagonismo junto al glifosato, se encontró que el bioindicador *S. intermedius*, la mezcla $Cu_2(OH)_3Cl/Gli$ presenta un bajo sinergismo cercano al efecto aditivo que se intensifica al aumentar las concentraciones, mientras que la mezcla $CuSO_4/Gli$ presenta un efecto antagónico el cual se acerca al efecto aditivo al aumentar las concentraciones. En el bioindicador *A. franciscana*, ambas mezclas presentan un efecto aditivo que se mantiene al aumentar las concentraciones, sin embargo, en la mezcla

$Cu_2(OH)_3Cl/Gli$ este efecto es hasta un punto donde finaliza y comienza un efecto antagónico al aumentar las concentraciones de ambos plaguicidas.

REFERENCIAS

- Abreu-Grobois, F. A. (1983). Population genetics of *Artemia* (Doctoral dissertation, University College of Swansea).
- Agah, H., Rahmanpour, S., & Shejoooni Fumani, N. (2013). Organic carbon and organic matter levels in sediments of the Strait of Hormoz, the Persian Gulf. *Journal of the Persian Gulf*, 4(13), 31-37.
- Agnieszka, B; Tomasz, C; & Jerzy, W. (2014). Chemical properties and toxicity of soils contaminated by mining activity. *Ecotoxicology (London, England)*, 23(7), 1234–1244. doi:10.1007/s10646–014–1266–y
- Alfaro, M. (1999). Contaminación del aire: emisiones vehiculares, situación actual y alternativas (Primera ed.). San José, C. R.: EUNED.
- Alloway, B., & Ayres, D. (1997). *Chemical principles of environmental pollution* (Second ed.). New York: CRC Press.
- Amat, F. (1985). Utilización de *Artemia* en acuicultura. *Informes Técnicos del Instituto de Investigaciones Pesqueras*. Barcelona.
- Anderson, S.L., Hose, J.E. and Knezovich, J.P. (1998). Genotoxic and developmental effects in sea urchins are sensitive indicators of effects of genotoxic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13: 1033-1041.
- Aparicio, V. & Costa, J. L. (2013). Soil quality indicators under continuous cropping systems in the Argentinean Pampas. *Soil & Tillage Research*, 96, 155-165. DOI: 10.3232/SJSS.2015.V5.N3.04.
- Aquaria. (2018). Instituto de Acuicultura Torre de la Sal. Recuperado de: <https://iats.csic.es/especies-auxiliares-acuicultura-larvicultura-ecotoxicologia/lineas->

investigacion-especies-auxiliares-acuicultura-larvicultura-ecotoxicologia/eclosion-quistes-artemia-jcn/

Baker, D., Shepherd, A. W., Jenane, C., & da Cruz, S. M. (2013). Agroindustrias y desarrollo. Roma.

Barata, C., Hontoria, F., Amat, F., & Browne, R. (1996). Demographic parameters of sexual and parthenogenetic *Artemia*: temperature and strain effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 196(1-2), 329-340.

Barceló, D., & López, M. J. (2007). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Convenio Universidad de Sevilla-Ministerio de Medio Ambiente. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona.

BASF. (2020). Agricultural Services España. Recuperado de: <https://www.agro.basf.es/es/Camposcopio/Secciones/Enfermedades-y-plagas/Conoce-el-Mildiu-y-preveelo/>

Baudouin, M. F., & Scoppa, P. (1974). Acute toxicity of various metals to freshwater zooplankton. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 12(6), 745-751.

Bautista, F. Z. (1999). Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados (Primera ed.). Mérida, Yucatán: UADY.

Bayer. (2022). Bayer Cropscience, Producto Cuprosan. Recuperado de: <https://www.cropscience.bayer.es/Productos/Fungicidas/Cuprosan-520-SC>

Bayne (1986). En *Toxicología fundamental*. Ed. Científico Médicas. 2ª edición. 1988, p. 408.

Begon, M.; Harper, J. L.; Townsend, C. R. (1999). *Ecología; individuos, poblaciones y comunidades* (No. 04; QH541, B43y 1999). Barcelona: Omega. DOI: 10.1016/j.tree.2008.07.011

Bejarano, F. G., Márquez, D. A., Solís, J. D. Á., Meraz, E. A., Aguilar, O. A., Arriaga, J. A. L., ... Rodríguez, I. E. M. (2017). Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México, 364.

- Bellí, N., Bau, M., Marín, S., Abarca, M. L., Ramos, A. J., & Bragulat, M. R. (2006). Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S40-S45.
- Bellinger, E. G., & Sigeo, D. C. (2015). *Freshwater algae: identification, enumeration and use as bioindicators* (Second edition). Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Inc.
- Bliss, C. I. (1939). The toxicity of poisons applied jointly 1. *Annals of applied biology*, 26(3), 585-615.
- Borkow, G., & Gabbay, J. (2005). Copper as a biocidal tool. *Current medicinal chemistry*, 12(18), 2163-2175.
- Borkow, G., & Gabbay, J. (2009). Copper, an ancient remedy returning to fight microbial, fungal, and viral infections. *Current Chemical Biology*, 3(3), 272-278.
- Butler, G. C. (Ed.). (1978). *Principles of ecotoxicology* (p. 350). New York: Wiley.
- Capone, D. G., Zehr, J. P., Paerl, H. W., Bergman, B., & Carpenter, E. J. (1997). *Trichodesmium*, a globally significant marine cyanobacterium. *Science*, 276(5316), 1221-1229.
- Carlisle, S. M. and Trevors, J. T. (1986). *Water, Air, and Soil Pollut.* 29, 189.
- Castañé, P. M., Topalián, M. L., Cordero, R. R., & Salibián, A. (2003). Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. *Revista de Toxicología*, 20(1), 13-18.
- Castillo, R. F., Cruz, A. B., Barra, J. E., & Gutiérrez, C. (2004). La calidad del suelo y sus indicadores. *Ecosistemas*, 13(2).
- Cattaneo, A., & Mousseau, B. (1995). Empirical analysis of the removal rate of periphyton by grazers. *Oecologia*, 103(2), 249-254.

- Cerejeira, M. J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valério, M. J., ... & Silva-Fernandes, A. M. (2003). Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Research*, 37(5), 1055-1063. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00462-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00462-6)
- Chairi, H., Fernández-Díaz, C., Navas, J. I., Manchado, M., Rebordinos, L., & Blasco, J. (2010). In vivo genotoxicity and stress defences in three flatfish species exposed to CuSO₄. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(6), 1279-1285.
- Chapman, D. (1996). *Water Quality Assessment: A guide to the use of biota, sediments and water in environmental monitoring*, Second. ed. E&FN Spon, an imprint of Chapman & Hall, London.
- Chiaudani, G., & Premazzi, G. (1992). Existing environmental conditions and intervention for the restoration of Brianza lakes.
- Chou, T. & Martin, N. (2005). *Compusyn for drug combinations. PC software and User's Guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations and the determination of IC₅₀, ED₅₀, and LC₅₀ Values*. Combosyn Paramuts, NJ.
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer research*, 70(2), 440-446. [10.1158/0008-5472.CAN-09-1947](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947)
- Chou, T. C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 27-55. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4)
- Codina, J. C., Perez-Garcia, A., Romero, P., & De Vicente, A. (1993). A comparison of microbial bioassays for the detection of metal toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 25(2), 250-254.

COFEPRIS (2009). Catálogo de Plaguicidas. http://www.cofepris.gob.mx/wb/cfp/catalogo_de_plaguicidas (Página visitada el 12-11-2021).

COFEPRIS. (2016). Catálogo de Plaguicidas. http://www.cofepris.gob.mx/wb/cfp/catalogo_de_plaguicidas (Página visitada el 01-01-2022).

CONICET. (2009). Informe - Evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Copper, A. (2008). A Guide to Working with Copper and Copper Alloys. In Technical Report. Copper development association.

Cordero, J., Guevara, M., Morales, E., & Lodeiros, C. (2005). Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Revista de Biología Tropical*, 53(3-4), 325-330.

Correa, F., Bückle, R., & De la Rosa, V. (1993). Hibridación en algunas poblaciones de *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae). *Revista de Biología Tropical*, 41, 97-101.

Cortés, C., de la Fuente, R., Contreras, A., Sánchez, A., Corrales, J. C., Martínez, S., & Orden, J. A. (2006). A survey of *Salmonella* spp and *Campylobacter* spp in dairy goat faeces and bulk tank milk in the Murcia region of Spain. *Irish Veterinary Journal*, 59(7), 1-3.

Cortés, D., Monroy-Dosta, M. D. C., Emerenciano, M. G. C., Castro-Mejía, G., Sofía, B., Bermúdez, S., & Correa, G. V. (2018). Effect on nutritional composition of produced bioflocs with different carbon sources (Molasses, coffee waste and rice bran) in Biofloc system. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2), 541-547.

Crisinel, A., Delaunay, D., Rossel, J., Tarradellas, H., Meye, H., Saiah, P., Vogel, C., Delisle, Blaise, C. (1994). Cyst based ecotoxicological tests using anostracans: Comparison of two species of *Streptocephalus*. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 9, 317-326

- Cyrino de O.E., Matos L.R., Roma P. F.J. (2004). Estudio comparativo sobre la susceptibilidad de las especies de agua dulce a los pesticidas a base de cobre. *Chemosphere* 56, 369-374. 6 pp
- D'Agostino, R., Pearson, E. S. (1973). Test for Departure from Normality. Empirical Results for the Distributions of b_2 and $\sqrt{b_1}$. *Biometrika* 60, 613-622. DOI: 10.2307/2335012
- De la Torre, A., Nuñez, J. & Carballo, M. (2004). Curso sobre toxicología ambiental y seguridad química. Sanidad Ambiental. CISA. Murcia.
- de Oliveira-Filho, E. C., Lopes, R. M., & Paumgarten, F. J. R. (2004). Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. *Chemosphere*, 56(4), 369-374.
- del Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y epidemiología*, 52(3), 372-387.
- DeLorenzo, M. E., Taylor, L. A., Lund, S. A., Pennington, P. L., Strozier, E. D., & Fulton, M. H. (2002). Toxicity and bioconcentration potential of the agricultural pesticide endosulfan in phytoplankton and zooplankton. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(2), 173-181.
- Ditta, I. B., Steele, A., Liptrot, C., Tobin, J., Tyler, H., Yates, H. M., ... & Foster, H. A. (2008). Photocatalytic antimicrobial activity of thin surface films of TiO₂, CuO and TiO₂/CuO dual layers on *Escherichia coli* and bacteriophage T4. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(1), 127-133.
- Duffus, J.H. (1986). Environmental toxicology and ecotoxicology. En: *Environmental toxicology and ecotoxicology-Environmental health* N°10. World Health Organization. Regional office for Europe. Programme on Chemical safety. Copenhagen.

- ECHA, EU Voluntary risk assessment of copper compounds. (2013). Recuperado de:
<https://echa.europa.eu/es/copper-voluntary-risk-assessment-reports>.
- Ecobichon, D. J. (2001). Pesticide use in developing countries. *Toxicology*, 160(1-3), 27-33.
[https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00452-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00452-2)
- Eddleston M, Singh S, Buckley N. (2005). Organophosphorous Poisoning (Acute). *Clinical Evidence*.
2005; 13:1744-55
- Eslava, P., Ramírez, W. & Rondón, I. (2007). Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos. Instituto de Acuicultura de los Llanos. Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana. 34-43.
- Eslava, P., Ramírez, W. y Rondón, I. (2003). Efectos del glifosato (GP) con énfasis en organismos acuáticos (Revisión de literatura). Instituto de Acuicultura de los Llanos. Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana. Pp70-100.
- Eslava Eljaiek, P. J. (2011). Ecología de la cepa de Artemia de Pozos Colorados, Santa Marta, Colombia (Master's thesis, Universidad del Magdalena).
- Falkowski, P. G., Barber, R. T., & Smetacek, V. (1998). Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *science*, 281(5374), 200-206.
- Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. A., Schofield, O., & Taylor, F. J. R. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science*, 305(5682), 354-360.
- FAO. (1989). Eliminación de Grandes Cantidades de Plaguicidas en Desuso en los Países en Desarrollo - Colección FAO: Eliminación de Plaguicidas. Roma, Italia.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). The FAO Programme on the Prevention and Disposal of Obsolete Pesticides. Rome, Italy.

FAOSTAT, FAO. (2018). Datos sobre alimentación y agricultura, 1990-2018 [En línea]. Fecha de consulta:25/09/20. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data>

Fargašová, A. (2001). Winter Third- to Fourth-Instar Larvae of *Chironomus plumosus* as Bioassay Tools for Assessment of Acute Toxicity of Metals and Their Binary Combinations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48(1), 1-5. doi:10.1006/eesa.2000.1980

Faúndez, G., Troncoso, M., Navarrete, P., & Figueroa, G. (2004). Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. *BMC microbiology*, 4(1), 1-7.

Fernández-Larrea Vega, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario.

Feron, V. J., & Groten, J. P. (2002). Toxicological evaluation of chemical mixtures. *Food and Chemical Toxicology*, 40(6), 825-839. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00021-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00021-2)

Feron, V. J., Groten, J. P., & van Bladeren, P. J. (1998). Exposure of humans to complex chemical mixtures: hazard identification and risk assessment. In *Diversification in Toxicology—Man and Environment* (pp. 363-373). Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-46856-8_32

Ferreira, C. M., Lombardi, J. V., Machado-Neto, J. G., Bueno-Guimaraes, H. M., Soares, S. R. C., & Saldiva, P. H. N. (2004). Effects of copper oxychloride in *Rana catesbeiana* tadpoles: toxicological and bioaccumulative aspects. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 73(3), 465-470.

- Finizio A, Villa S, Vighi M (2005). Predicting pesticide mixtures in surface waters from a given crop. *Agriculture Ecosystems and Environment* 111, 111-118
- Fontúrbel, R., & Molina, A. 2004 Origen del agua y el oxígeno. *Elementos: ciencia y cultura*, marzo/mayo voll.11, número 053 Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México <http://www.redalyc.org/pdf/294/29405301.pdf>
- Forget, G., Goodman, T., & De Villiers, A. (1993). Impact of pesticide use on health in developing countries: proceedings of a symposium held in Ottawa, Canada, 17-20 Sept. 1990. IDRC, Ottawa, ON, CA.
- Franklin, D. J., Brussaard, C. P., & Berges, J. A. (2006). What is the role and nature of programmed cell death in phytoplankton ecology? *European Journal of Phycology*, 41(1), 1-14.
- Frontera. (2021). Las microalgas como fuente de compuestos bioactivos en un programa de la Unión Europea. Recuperado de: <https://www.fronterarg.com/las-microalgas-como-fuente-de-compuestos-bioactivos-en-un-programa-de-la-union-europea/>
- Fryday, S., & Thompson, H. (2012). Toxicity of pesticides to aquatic and terrestrial life stages of amphibians and occurrence, habitat use and exposure of amphibian species in agricultural environments. *EFSA Supporting Publications*, 9(9), 343E.
- Gaete, H., & Paredes, K. (1996). Toxicidad de mezclas de contaminantes químicos sobre el cladóceros *Daphnia magna*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 12(1), 23-28.
- Gant, V. A., Wren, M. W., Rollins, M. S., Jeanes, A., Hickok, S. S., & Hall, T. J. (2007). Three novel highly charged copper-based biocides: safety and efficacy against healthcare-associated organisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(2), 294-299.
- Giesy, J.P. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. Environ. Toxicol.* 167:35–120.

- Gladstone S. (2002). Informe de consultoría preparado para PROARCA/SIGMA. Contaminación por plaguicidas en las Cuencas Hidrográficas que desembocan en el Golfo Fonseca y oportunidades para su prevención y mitigación. USAID.
- Glyphosate facts. (2013). Sitio de internet: <https://www.glifosato.es/mecanismo-de-accion-del-glifosato>.
- Grădilă, M. (2015). Environmental risk assessment of some copper-based fungicides according to the requirements of good laboratory practice. *AgroLife Scientific Journal*, 4(1), 74-8.
- Haddock, S. H., Moline, M. A., & Case, J. F. (2010). Bioluminescence in the sea. *Annual Review of Marine Science*, 2, 443-493.
- Haglund, K. U. R. T. (1997). The use of algae in aquatic toxicity assessment. *Progress in phycological research*, 12, 181-212.
- Halmi, M. I. E; Jirangon, H; Johari, W. L. W; Abdul Rachman, A. R; Shukor, M. Y; & Syed, M. A. (2014). Comparison of Microtox and Xenoassay Light as a Near Real Time River Monitoring Assay for Heavy Metals. *The Scientific World Journal*, 2014, 834202. doi:10.1155/2014/834202
- Heinlaan, M; Kahru, A; Kasemets, K; Kurvet, I; Waterlot, C; Sepp, K; Dubourguier, H.C; Douay, F. (2007) Rapid screening for soil ecotoxicity with a battery of luminescent bacteria tests. *Alternatives to Laboratory Animals* Mar;35(1):101–10.
- Herkovits, J. & Perez, C. (2006). Ecotoxicología: Su importancia para la protección del medio ambiente, la salud humana y la comprensión del proceso evolutivo. *Instituto de Ciencias Ambientales y Saludables*, 8: 14-29.
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173.

- Hernández-Trujillo, S., Esqueda-Escárcega, G., & Palomares-García, R. (2010). Variabilidad de la abundancia de zooplancton en Bahía Magdalena Baja California Sur, México (1997-2001). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 38(3), 438-446.
- Hodgson, E. (2004). *Introduction to Toxicology. A textbook of modern toxicology. Edition 3*, 1: 3-12.
- Hsieh, C. Y., Tsai, M. H., Ryan, D. K., & Pancorbo, O. C. (2004). Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fisheri* in the Microtox® chronic toxicity test. *Science of the Total Environment*, 320(1), 37-50.
- Huber, A., Bach, M., & Frede, H. G. (2000). Pollution of surface waters with pesticides in Germany: modeling non-point source inputs. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 80(3), 191-204. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(00\)00145-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(00)00145-6)
- Huisman, J., & Hulot, F. D. (2005). Population dynamics of harmful cyanobacteria. In *Harmful cyanobacteria* (pp. 143-176). Springer, Dordrecht.
- Hutchinson, G. E. (1961). The paradox of the plankton. *The American Naturalist*, 95(882), 137-145.
- Iannacone, J. A. & Alvarino, L. (1996). Efecto de los metales pesados en la sobrevivencia del pez larvívoro *Poecilia reticulata* (Poeciliidae) "Guppy". Lima. Resúmenes de la V Reunión Científica. ICBAR, UNMSM.
- Iannacone, J. A., Alvarino, L., Paredes, C., Alayo, M., Mamani, N., Bonifacio, J., ... & Miglio, M. C. (2011). Evaluación del riesgo ambiental de carbofurano en bioensayos con organismos no blanco. *Acta Toxicológica Argentina*, 19(1), 19-31.
- Iannacone, J., & Alvarino, L. (2011). Aspectos cuantitativos de los parásitos del pejesapo *Sicyases sanguineus* (Müller & Troshel, 1843)(Perciformes: Gobiesocidae) de la zona costera de

Chorrillos, Lima, Perú. Neotropical Helminthology, 5(1).
<https://doi.org/10.24039/rnh2011511036>

Iannacone, J., Alvarino, L., & Mamani, N. (2011). Estimación de la Toxicidad Combinada de Mezclas de Furadán 4F® y Monofos® sobre *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 6(1): 23–29.

Iannacone-Oliver, J. A., & Dale, W. E. (1999). Protocolo de bioensayo ecotoxicológico para evaluar metales pesados contaminantes de agua dulce con *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae) y *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera), en el Río Rímac, Lima, Perú. *Revista Peruana de Entomología*, 41(1), 111-120.

INE (Instituto Nacional de Ecología). (2003). Introducción al análisis de riesgos ambientales. México DF: Instituto Nacional de Ecología (INESEMARNAT).

INEGI (2016). Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera EMIM. INEGI. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/encuestas/establecimientos/secundario/emim/tabulados.aspx>.

INIFAP (2014) Desecación química de sorgo para grano. SAGARPA-INIFAP. Sept. 2014. En <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/988.pdf>

INTA (2011). Recuperado de: <https://www.tecnicoagricola.es/gabinete-de-ingenieros-tecnico-agricolas-y-peritos-agricolas/>

ISO 11348-2:2007. Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 2: Method using liquid-dried bacteria.

- Jaramillo, F., Meléndez, M.E. & Aldana, M.L. (2009). Toxicología de los Plaguicidas. En Toxicología Ambiental. 270. Textos Universitarios. Universidad Autónoma de Aguascalientes - Universidad de Guadalajara, México.
- Jerez, J., Peralta, J., Tapia, F., Mejías, J., Jerez, A., & Encina, F. (2006). Estudio de metodologías para la evaluación de riesgo ambiental de la aplicación de plaguicidas. Informe final. Ministerio de agricultura servicioagrícola y ganadero.
- Jones, O. A., Voulvoulis, N., Lester, J. N. (2001) Environ. Toxicol. 22, 1383.
- Karntanut, W., & Pascoe, D. (2002). The toxicity of copper, cadmium, and zinc to four different Hydra (Cnidaria: Hydrozoa). Chemosphere, 47(10), 1059-1064.
- Katz, M. E., Finkel, Z. V., Grzebyk, D., Knoll, A. H., & Falkowski, P. G. (2004). Evolutionary trajectories and biogeochemical impacts of marine eukaryotic phytoplankton. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, 35, 523-556.
- Knauer, K., Behra, R., & Sigg, L. (1997). Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus* (chlorophyta) 1. Journal of Phycology, 33(4), 596-601.
- Knezovich, J. P. (1994). Chemical and biological factors affecting bioavailability of contaminants in seawater. Bioavailability: physical, chemical and biological interactions. Lewis Publishers, London, 23-30.
- Kokkali, V. (2011). Electrochemical peroxidation of contaminated water and assessment of the toxicity using existing and novel bioassays.
- Kolkwitz, R & W. A. Marsson, 1902. Grundsätze für die biologische Beurteilung des wassers nach seinerflora und fauna. Mitt. Prüfungsants. Wasserversog. Abwasser ein. 1: 33-72
- Kolkwitz, R & W. A. Marsson, 1908. Ecology of plant saprobia. Biology of Water Pollutin. 26:505-519.

- Kolkwitz, R & W. A. Marsson, 1909. Ökologie der tierischen Saprobien. Beiträge Zur Lehre von der biologische Gewässerbeuteilung. Internationale Reveu der gesamten Hydrobiologie 2: 126-152.
- Konstantinou, I. K., Hela, D. G., & Albanis, T. A. (2006). The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environmental Pollution*, 141(3), 555-570. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.07.024>
- Kumbhar, A. S., Padhye, S. B., Saraf, A. P., Mahajan, H. B., Chopade, B. A., & West, D. X. (1991). Novel broad-spectrum metal-based antifungal agents. *Biology of Metals*, 4(3), 141-143.
- La Torre, A., Spera, G., Talocci, S., & Cargnello, G. (2007). Evaluation of the effectiveness of natural alternative copper products and low-rate copper formulations against grape downy mildew in organic viticulture.
- Latorre, B. ed. 1989. Fungicidas y nematicidas, avances y aplicabilidad. Colección en Agricultura.Publicación de la Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile. 216 p.
- Levy, J. L., Stauber, J. L., & Jolley, D. F. (2007). Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of The Total Environment*, 387(1-3), 141-154. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.07.016>
- Lewis, C., Ellis, R. P., Vernon, E., Elliot, K., Newbatt, S., & Wilson, R. W. (2016). Ocean acidification increases copper toxicity differentially in two key marine invertebrates with distinct acid-base responses. *Scientific Reports*, 6(1), 1-10.
- Livingstone, D. R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Médecine Vétérinaire (France)*.
- Lodhi, H. S., Khan, M. A., Verma, R. S., & Sharma, U. D. (2004). Acute toxicity of copper sulphate to fresh water prawns. *Journal of Environmental Biology*, 27(3), 585-588.

- Loewe, S. T., & Muischnek, H. (1926). Über kombinationswirkungen. Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 114(5), 313-326.
- Malpica, A. S., Castro, T. B., Sandoval, H. T., Castro, J. M., De Lara, R. A., & Castro Mejía, G. (2004). Composición del contenido de ácidos grasos en tres poblaciones mexicanas de *Artemia franciscana* de aguas epicontinentales. Revista de Biología Tropical, 52(1), 297-300.
- Martín, A., Serrano, S., Santos, A., Marquina, D., & Vázquez, C. (2010). Bioluminiscencia bacteriana. Reduca (Biología), 3(5).
- Mazon, A. F., Monteiro, E. A. S., Pinheiro, G. H. D., & Fernandez, M. N. (2002). Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. Brazilian Journal of Biology, 62, 621-631. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400010>
- Meighen, E.A. 1993. Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. FASEB Journal, 7: 1016-1022.
- Mendoza-Rodríguez, R. (2009). Toxicidad aguda del sulfato de cobre en postlarvas de camarón *Cryphiops caementarius*. Archivos de Zootecnia, 58(221), 103-110.
- Mesnage, R., Defarge, Ni., Vendômois, J. & Séralini, G.- E. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. Food and Chemical Toxicology, 84, 133-153. DOI: 10.1016/j. fct.2015.08.012.
- Miazek, K., Iwanek, W., Remacle, C., Richel, A., & Goffin, D. (2015). Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial product biosynthesis: a review. International Journal of Molecular Sciences, 16(10), 23929-23969.
- Monteoliva, A. P., & Muñoz, C. (2000). La gestión limnológica y el mantenimiento de la integridad ecológica en los embalses. La Gestión del Agua, 51, 60-69.

- Mueller, J. G.; Middaugh, D. P.; Lantz, S. E. & Chapman, P. J. (1991). Biodegradation of creosote and pentachlorophenol in contaminated groundwater: chemical and biological assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5), 1277–1285.
- Mueller, T. C., Massey, J. H., Hayes, R. M., Main, C. L., & Stewart, C. N. (2003). Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 680-684.
- Mulligan, A. M., Wilson, M., & Knowles, J. C. (2003). The effect of increasing copper content in phosphate-based glasses on biofilms of *Streptococcus sanguis*. *Biomaterials*, 24(10), 1797-1807.
- Mullineaux, C. W., Mariscal, V., Nenninger, A., Khanum, H., Herrero, A., Flores, E., & Adams, D. G. (2008). Mechanism of intercellular molecular exchange in heterocyst-forming cyanobacteria. *The EMBO journal*, 27(9), 1299-1308.
- Mumcuoglu, K. Y., Gabbay, J., & Borkow, G. (2008). Copper oxide-impregnated fabrics for the control of house dust mites. *International Journal of Pest Management*, 54(3), 235-240.
- Munkittrick, K., Power, E. A., & Sergy, G. A. (1991). The relative sensitivity of microtox®, daphnid, rainbow trout, and fathead minnow acute lethality tests. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6(1), 35-62.
- Myers, J.P., Zoeller, R.T. & Vom Saal, F.S. (2016). A clash of old and new scientific concepts in toxicity, with important implications for public health. *Environ Health Perspect*, 117(11), 1652–16555. DOI: 10.1289%2Fehp.0900887.
- National Research Council, National Research Council (US). Committee on Techniques for Estimating Probabilities of Extreme Floods, & National Research Council Staff. (1988). Estimating probabilities of extreme floods: methods and recommended research. National Academies.

- NCAP. (1998). En: NCAMP FACTSHEET / A BEYOND PESTICIDES. Glyphosate. En: Chemical Watch Fact Sheet. 2001. 1(1):16-17
- Neli. (2015). Biología de la Artemia. En: <https://www.bioartemia.com/2017/03/03/biologia-de-la-artemia-sp/> [Última visita: 22 de noviembre de 2021].
- Nivia, E. (2001). Las fumigaciones aéreas sobre cultivos ilícitos sí son peligrosas – Algunas aproximaciones Conferencia “Las Guerras en Colombia: Drogas, Armas y Petróleo” (The Wars in Colombia: Drugs, Guns and Oil).
- NMX-AA-110-SCFI-1995, Análisis de agua – evaluación de toxicidad aguda con artemia franciscana kellogg (crustacea – anostraca) – método de prueba.
- NMX-AA-112-SCFI-2017. Análisis de Agua y Sedimentos - Evaluación de Toxicidad Aguda con *Vibrio fischeri* - Método de Prueba
- NOM-127-SSA1-1994. NORMA Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Recuperado de: <http://www.agrolab.com.mx/sitev002/sitev001/assets/nom-127-ssa1-1994.pdf>
- Nyholm, S. V., & McFall-Ngai, M. (2004). The winnowing: establishing the squid–vibrio symbiosis. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 632-642.
- OECD. (2011). Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069923-en>.
- Onorati, F.; Mecozzi, M. (2004). Effects of two diluents in the Microtox toxicity bioassay with marine sediments. *Chemosphere*, 54: 679-687.

- Ossana, N. (2011). Biomarcadores de contaminación acuática: estudios en los ríos Luján y Reconquista. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Páez-Osuna, F., & Frías-Espericueta, M. G. (2005). Bioacumulación, distribución y efectos de los metales pesados en los peneidos. En F. Páez-Osuna, Camaronicultura y Medio Ambiente (págs. 245-269). México, D.F.: UNAM, El Colegio de Sinaloa.
- Papadopoulos, A., Lazaridou, E., Mauridou, G., & Touraki, M. (2004). Glutathione S-transferase in the branchiopod *Artemia salina*. *Marine Biology*, 144(2), 295-301. doi:10.1007/s00227-003-1203-8
- Paredes, C., & Anaya, R. (2015). Efecto agudo del oxiclورو de cobre y del butaclor sobre el "camarón de río" *Cryphiops caementarius* (Molina 1782). *Ecología Aplicada*, 14(1), 71-74.
- Patrick, R. (1949). A proposed biological measure of stream conditions, based on survey of the Conestoga basin, Lancaster County, Pennsylvania *Proc. Acad. Nat. Scvi. Philad.* 101: 277-341.
- Patrick, R. (1950). Biological measure of stream conditions. *Sewage ind. Wastes.* 22: 926-939
- Pérez, W. y Forbes, G. (2015). Manejo integrado del tizón tardío. Hoja divulgativa 5. División de manejo integrado de cultivos. Lima, Perú. ISBN: 978-92-9060-320-7
- Persoone, G., Van del Vel, A., Van Steertegem, M. & De Nayer, B. (1989). Predictive value of laboratory tests with aquatic invertebrates: influence of experimental conditions. *Aquatic Toxicology*, 14(2), 149-167. DOI: 10.1016/0166445X (89)90025-8.
- Peterson, H. G., Boutin, C., Martin, P. A., Freemark, K. E., Ruecker, N. J., & Moody, M. J. (1994). Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. *Aquatic Toxicology*, 28(3-4), 275-292. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00408-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00408-7)

- Pizzolato, L., Howell, S. E., Derksen, C., Dawson, J., & Copland, L. (2014). Changing sea ice conditions and marine transportation activity in Canadian Arctic waters between 1990 and 2012. *Climatic change*, 123(2), 161-173.
- Plackett, R. L., & Hewlett, P. S. (1948). Statistical aspects of the independent joint action of poisons, particularly insecticides: I. the toxicity of a mixture of poisons. *Annals of Applied Biology*, 35(3), 347-358.
- Plackett, R. L., & Hewlett, P. S. (1952). Quantal responses to mixtures of poisons. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 14(2), 141-154.
- Pursitasari, I. D., Suhardi, E., & Fitriana, I. (2019). Development of Context-Based Teaching Book on Environmental Pollution Materials to Improve Critical Thinking Skills. In 3rd Asian Education Symposium (AES 2018). Atlantis Press.
- Qiu, H., Geng, J., Ren, H., Xia, X., Wang, X. & Yu, Y. (2013). Physiological and biochemical responses of *Microcystis aeruginosa* to glyphosate and its Roundup® formulation. *Journal of Hazardous Materials*, 248-249, 172-176. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.12.033.
- Quevedo, C., Morales, S. P., & Acosta, A. (2008). Crecimiento de *Scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Vitae*, 15(1), 25-31.
- Repetto, G., Moreno, I. M., del Peso, A., Repetto, M., & Cameán, A. M. (2001). La búsqueda de información toxicológica: módulo práctico de aprendizaje. *Revista de Toxicología*, 18(2), 92-98.
- Repetto, M. (1988). *Toxicología fundamental*. Ed. Científico Médicas. 2ª edición. 1988, p. 408.
- Rioboo C., Prado R., Herrero C. & Cid A. (2007). Population growth study of the rotifer *Brachionus* sp. fed with triazine-exposed microalgae. *Aquatic Toxicology*, 83: 247-253.
- Riva Juan, M. (1991). *Nociones y planteamientos en la preservación del medio ambiente acuático*.

- Roda, A., Pasini, P., Mirasoli, M., Michelini, E., & Guardigli, M. (2004). Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *TRENDS in Biotechnology*, 22(6), 295-303.
- Roldán Pérez, G. (1999). Los macroinvertebrados y su valor como indicadores de la calidad del agua. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*. 23(88): 375-387. ISSN 0370-3908.
- Ronco, A., & Díaz, M. C. B. (2004). Interpretación y manejo de resultados. En G. Castillo Morales, *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua* (págs. 146-147). México: IMTA.
- Rosenström, U., & Lepistö, L. (1996). Phytoplankton indicator species of different types of boreal lakes. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 131-140.
- Rosenthal, P. (1990). Protección del medio ambiente e higiene laboral desde el punto de vista del fabricante de colorantes. ¿Hasta qué punto son peligrosos los colorantes textiles? *ITB Tintorería/Acabado/Estampado 1990* pp. 58-66.
- Rueppel ML, Brightwell BB, Schaefer J, Marvel JT. (1997). "Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1977; 25:517-528.
- Salizzato, M., Bertato, V., Pavoni, B., Ghirardini, A. V. y Ghetti, P. F. (1998) *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17, 655–661
- San Juan, E. M. (2010). Movilidad de Pb y Ni en suelos contaminados del valle del Mezquital Hidalgo. Tesis (Ingeniero Agrónomo especialista en suelos), Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México.
- Sánchez- Fortún S., Marvá F. & D'ors A. (2008). Inhibition of growth and photosynthesis of selected green microalgae as tools to evaluate toxicity of dodecylethyldimethyl-ammonium bromide. *Ecotoxicology*, 17: 229-234.

- Scelzo, M. A. (1997). Toxicidad del cobre en larvas nauplii del camarón comercial *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Investigaciones Marinas*, 25, 177-185.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-71781997002500013>
- SCHER (2007), Opinion on risk assessment on indoor air quality, 29 May 2007.
http://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/04_scher/docs/scher_o_055.pdf
(Accessed on 14 Dec. 2011)
- Schuette, J., 1998. Environmental fate of glyphosate. *Environmental Monitoring & Pest Management*, Department of Pesticide Regulation, Sacramento.
- Schultz, T. P., D. D. Nicholas, and A. F. Preston. 2007. A brief review of the past, present and future of wood preservation. *Pest Manag. Sci.* 63: 784–788
- Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B., Johnson, C. A., Von Gunten, U., & Wehrli, B. (2006). The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*, 313(5790), 1072-1077. <https://doi.org/10.1126/science.1127291>
- Schwinn, F. J., y Margot, P. (1991). Control with chemicals. *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. *Advances in Plant Pathology*. D. S. Ingram and P. H. Williams, eds. Academic Press, London. 225-265.
- SIAVI. (2014). Sistema de información Arancelaria Vía Internet. Fracción 2931.90.19 Sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina. Sal de glifosato.
- Sigeo, D. C. (2005). *Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment*. John Wiley & Sons.
- Smetacek, V. (1999). Revolution in the ocean. *Nature*, 401(6754), 647-647.

- Snell, T. W., Moffat, B. D., Janssen, C., & Persoone, G. (1991). Acute toxicity tests using rotifers: IV. Effects of cyst age, temperature, and salinity on the sensitivity of *Brachionus calyciflorus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21(3), 308-317.
- Solís, L. M., & López, J. A. (2003). *Principios básicos de contaminación ambiental* (Primera ed.). Toluca, México: UAEM.
- Solís-González, G., Cortés-Téllez, A. A., Téllez-Pérez, Z. I., & Bartolomé-Camacho, M. C. (2019). Toxicidad aguda del herbicida N-(fosfometil) glicina sobre representantes planctónicos *Artemia franciscana* y *Microcystis aeruginosa*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 22(1), 1-8.
- Somsiri, C. (1982). Acute toxicity of mercury, copper and zinc to the Nile tilapia (*Tilapia nilotica* Linn.). *Warasan kan Pramong*.
- Sorgeloos, P. L. (1986). *Manual for the culture and use of brine shrimp Artemia in aquaculture*. Prepared for the Belgian Administration for Development Cooperation. The Food and Agricultural Organization of the United Nations. Gante, Bélgica.
- Spiro, T. G., & Stigliani, W. M. (2004). *Química Medioambiental*. Madrid: PRENTICE HALL.
- Sprague, J. B. (1995). Factors that modify toxicity. En G. M. Rand, *Fundamentals of aquatic toxicology* (Segunda ed., págs. 1012-1051). USA: Taylor and Francis.
- Sprankle, P., Meggitt, W.F. y Penner, D. (1975). "Rapid inactivation of glyphosate in soils". *Weed Sci.* 23: 224-228.
- Spurgeon, D. J., Jones, O. A., Dorne, J. L. C., Svendsen, C., Swain, S., & Stürzenbaum, S. R. (2010). Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Science of the total environment*, 408(18), 3725-3734.
- Sterner, R.W. & Elser, J.J. (2002). *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*. Princeton University Press, Princeton, NJ.

- Suárez, M. V., & González, V. A. (2014). *Desarrollo Sustentable: Un Nuevo Mañana* (Primera ed.). México: Grupo Editorial Patria.
- Teuschler, L. K. (2007). Deciding which chemical mixtures risk assessment methods work best for what mixtures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 223(2), 139-147.
- Thomson, W. T. (2000). *Agricultural Chemicals. Book IV – fungicides*, pp. 3 – 11.
- Tichý, M., Bořek-Dohalský, V., Matoušová, D., Rucki, M., Feltl, L., & Roth, Z. (2002). Prediction of acute toxicity of chemicals in mixtures: worms *Tubifex tubifex* and gas/liquid distribution. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 13(2), 261-269.
- Tilman, D. (1977). Resource competition between plankton algae: an experimental and theoretical approach. *Ecology*, 58(2), 338-348.
- Tilman, D., Kilham, S. S., & Kilham, P. (1982). Phytoplankton community ecology: the role of limiting nutrients. *Annual review of Ecology and Systematics*, 13(1), 349-372.
- Tornero-Velez R., Egeghy PP, and Cohen Hubal EA. (2011) Biogeographical Analysis of Chemical Co-Occurrence Data to Identify Priorities for Mixtures Research. *Risk Analysis*, DOI: 10.1111/j.1539-6924.2011.01658.x
- Torres, D. A. (2008). *Propuesta metodológica para el análisis de riesgo ambiental en sistemas productivos agrícolas bajo invernadero en Colombia* (Tesis de Grado). Universidad de la Salle. Bogotá, D.C. Colombia.
- Triantaphyllidis, G., Pouloupoulou, K., Abatzopoulos, T., Pinto Pérez, C., & Sorgeloos, P. (1995). International study on *Artemia* XLIX. Salinity effects on survival, maturity, growth, biometrics, reproductive and lifespan characteristics of a bisexual and a parthenogenetic population of *Artemia*. *Hydrobiologia*, 302(3), 215-227. doi:10.1007/BF00032111

- Tsui, M. T. K. & Chu, L. M. (2005). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52, 1189-1197. DOI: 10.1016/S0045-6535(03)00306-0.
- Tuchman, N. C. (1996). The role of heterotrophy in algae. *Algal ecology: freshwater benthic ecosystems*, 299-319.
- UNEP. (2000). América Latina y el Caribe. *Perspectivas del Medio Ambiente. GEO 2000*.
- USEPA. US Environmental Protection Agency. (1985). Guidelines for deriving numerical national water quality criteria for the protection of aquatic organisms and their uses.
- USEPA. US Environmental Protection Agency. (2002). Development of a Framework for Metals and Guidance for Characterizing and Ranking Metals. Metal Action Plan Group. EPA/630/P-02/003A.
- USEPA. US Environmental Protection Agency. (2004). The ecological effects of metals. Risk Assessment Forum. Washington, DC.
- USEPA. US Environmental Protection Agency. (2007). Framework for Metals Risk Assessment. Office of the Science Advisor. Risk Assessment Forum. EPA 120/R-07/001.
- Vassiliou, G. (2016). Factors Affecting Risk Assessment of Pesticides in Water Bodies: A Review. *MOJ Toxicology*, 2(1): 00030.
- Vázquez, G., Castro, G., González, I., Pérez, R., & Castro, T. (2006). Bioindicadores como herramientas para determinar la calidad del agua. 7.
- Velasco Martínez, J. A. E. (2016). Estandarización del bioensayo con *Artemia franciscana*, (Flössner, 1972) y el efecto ecotoxicológico del Sulfato de cobre (II) pentahidratado.

- Velasco-Santamaría, Y. M., Gómez-Manrique, W., & Calderón-Bernal, J. M. (2006). Toxicidad aguda del sulfato de cobre (CuSO₄) en alevinos de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) bajo condiciones de aguas blandas. *Orinoquia*, 10(1), 64-70.
- Vera, M., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G., Zagarese, H. & Ferrano, M. (2014). New evidence of Roundup (glyphosate formulation) impact on the periphyton community in the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19(4), 710-721. DOI: 10.1007/s10646-009-0446-7.
- Verro R, Finizio A, Otto S, Vighi M (2009). Predicting pesticide environmental risk in intensive agricultural areas. II: screening level risk assessment of complex mixtures in surface waters. *Environment, Science and Technology*. 43, 530-537
- Visviki, I., & Rachlin, J. W. (1991). The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine *Alga Dunaliella minuta*, in both acute and chronic exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 20(2), 271-275.
- Viver-vid. (2022). Viter Vinicultura. Recuperado de: <https://www.vitivinicultura.net/mildiu-de-la-vid-enfermedades-vina.html>
- Walter, C., & Stützel, H. (1998). A new method for assessing the sustainability of land-use systems (II): Evaluating impact indicators. *Ecological economics*, 68(5), 1288-1300.
- Weaver, L., Michels, H. T., & Keevil, C. W. (2008). Survival of *Clostridium difficile* on copper and steel: futuristic options for hospital hygiene. *Journal of Hospital Infection*, 68(2), 145-151.
- Weber, D. J., & Rutala, W. A. (2001). Use of Metals as Microbicides in Preventing. *Disinfection, sterilization, and preservation*, 411.
- WHO. (1990) Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture. Ginebra: WHO 1990. <http://www.who.int/heli/risks/toxics/chemicals/en/index.html>

- WHO. World Health Organization. (1994). Glyphosate. Environmental Health Criteria, No. 159. Geneva: World Health Organization, USA. DOI: 10.1002/food.19960400341.
- WHO. World Health Organization. (2010). International code of conduct on the distribution and use of pesticides: Guidelines for the Registration of Pesticides (No. WHO/HTM/NTD/WHOPES/2010.7). World Health Organization.
- Williams, G.M., Kroesb, R. & Munro, I.C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31(2), 117-165. DOI: 10.1006/rtp.1999.1371.
- Williams, W., & Geddes, M. (1881). Anostracans of Australan Salt Lake, with reference, to a comparison of Parartemia and Artemia. En R. Browne, P. Sorgeloos, & C. Trotman, *Artemia Biology* (págs. 351-368). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Wilson, T., & Hastings, J. W. (1998). Bioluminescence. *Annual review of cell and developmental Biology*, 14(1), 197-230.
- Zacharia, J. T. (2011). Identity, physical and chemical properties of pesticides. *Pesticides in the modern world-trends in pesticides analysis*, 1-18.
- Zatcoff, R. C., Smith, M. S., & Borkow, G. (2008). Treatment of tinea pedis with socks containing copper-oxide impregnated fibers. *The Foot*, 18(3), 136-141.
- Zavitsanos, P.; Meng, Chin-Kai.; Grey, L.; Nguyen, B.; Yang, P. (2006). Analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid by liquid chromatography/mass spectrometry. En: Agilent Technologies (www.bst.com.au/resources/lcms%20glyphosate%20&%20aminometil.pdf).
- Zeraatkar, A. K., Ahmadzadeh, H., Talebi, A. F., Moheimani, N. R., & McHenry, M. P. (2016). Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *Journal of Environmental Management*, 181, 817-831.

Zhou, C. F., Wang, Y. J., Li, C. C., Sun, R. J., Yu, Y. C., & Zhou, D. M. (2012). Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental pollution*, 180, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.016>

Zidan, Z. H., Ragab, F. M., & Mohamed, K. H. (2002). Molluscicidal activities of certain pesticide and their mixtures against *Biomphalaria alexandrina*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 32(1), 285-296.

Zyadah, M. A., & Abdel-Baky, T. E. (2000). Toxicity and bioaccumulation of copper, zinc, and cadmium in some aquatic organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(5), 740-747.