



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO- FARMACOBIOLOGÍA

**VALORACIÓN TOXICOLÓGICA
DEL SULFATO DE COBRE Y VERDE DE MALAQUITA
EN UN MODELO BIOSENSOR
PARA EL SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN DEL RIESGO
CONTAMINANTE DERIVADO DE LA PUESTA EN
MARCHA DE DESALADORAS**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO-FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

P.Q.F.B. ANA VERÓNICA HERNÁNDEZ LÓPEZ

ASESOR DE TESIS:

D.C. MARÍA CARMEN BARTOLOMÉ CAMACHO

MORELIA, MICHOACÁN

NOVIEMBRE 2008

ABREVIATURAS

IMTA: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua
EPA: Environmental Protection Agency
MSF: Destilación Multi- Stage Flash
MED: Destilación Multiple Efecto
OSHA: Occupational Safety & Health Administration
ATP: Adenosín trifosfato
FDA: Food and Drug Administration
QUATs: Compuestos de amonio cuaternarios
PNEC: Concentración Prevista sin Efectos
DL₅₀: Dosis letal 50
CL₅₀: Concentración letal 50
CE₅₀: Concentración eficaz 50
CI₅₀: Concentración inhibitoria 50
NOEL/C: Nivel/concentración sin efecto observado
LOEL/C: Nivel/concentración con mínimo efecto observado
PEC: Concentración Ambiental Prevista
CFR: Code of Federal Regulations
TLCP: Toxicity Characteristic Leaching Procedure test
NSF: Fundación Nacional de Ciencias
OECD: Organization for Economic Cooperation and Development
OMRI: Organic Materials Review Institute
AWP: Permeabilidad aparente del agua
CA: Actividad cardiaca
AZY: Actividad enzimática
HCY: Concentración de hemocianina
MO₂: Consumo de oxígeno
PaO₂: Presión arterial parcial de oxígeno
V/Q: Tasa ventilación/perfusión

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN

1.1 ESTADO ACTUAL DE LA CONTAMINACIÓN DE AGUAS MARINAS.

1.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA DESALINIZACIÓN.

1.3 SITUACIÓN DE LA DESALINIZACIÓN EN MÉXICO

1.4 FUNDAMENTOS DE LA DESALACIÓN DEL AGUA.

1.5 TECNOLOGÍAS EMPLEADAS EN LA DESALINIZACIÓN

1.5.1 Destilación Multi- Stage Flash (MSF)

1.5.2 Destilación Multiple Efecto (MED)

1.5.3 Sistema de compresión de vapor

1.5.4 Osmosis inversa

1.5.5 Electrodiálisis

1.5.6 Destilación por Membranas

1.5.7 Destilación solar

1.6 INCONVENIENTES DE LA DESALINIZACIÓN

1.7 VENTAJAS DE LA DESALINIZACIÓN

1.8 COMPUESTOS CONTAMINANTES MAS FRECUENTES EN LA DESALINIZACIÓN

1.8.1 Grupos principales de sustancias utilizadas en el tratamiento de desalinización.

1.9 BIOCIDAS

1.9.1 Condiciones de un buen biocida

1.9.2 Clasificación de biocida de acuerdo a su origen

1.9.3 Mecanismo de acción de biocidas

1.9.4 Grupos y tipos de biocidas de acuerdo a la Environmental Protection Agency (EPA)

2. RIESGO AMBIENTAL

2.1 IMPACTO DE LA DESALINIZACIÓN

2.2 PELIGROSIDAD DE LOS VERTIDOS DE AGUAS CONTAMINADAS

3. RELEVANCIA MEDIOAMBIENTAL DE LOS AMBIENTES DE ESTUARIO

3.1 UTILIZACION DE INVERTEBRADOS ACUÁTICOS EN INVESTIGACIÓN ECOTOXICOLÓGICA.

3.2 RELEVANCIA DE LA *ARTEMIA FRANCISCANA* EN LOS ESTUDIOS ECOTOXICOLÓGICOS SOBRE AMBIENTES DE AGUA SALADA.

4. *ARTEMIA FRANCISCANA*

4.1 INTRODUCCIÓN

4.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

4.3 ANATOMÍA EXTERNA

4.4 ANATOMÍA INTERNA

4.4.1 Sistema digestivo

4.4.2 Sistema vascular

4.4.3 Sistema respiratorio

4.4.4 Sistema osmoregulador y excreción.

4.4.5 Sistema reproductivo

4.5 COMPORTAMIENTO DE LA *ARTEMIA*

4.6 CICLO VITAL

II. OBJETIVOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. COMPUESTOS QUÍMICOS EMPLEADOS

2. OBTENCIÓN DE *ARTEMIA FRANCISCANA*

3. ESTUDIOS DE TOXICIDAD AGUDA: LETALIDAD

Distribución de larvas de *Artemia*

Exposición de larvas a los compuestos químicos

Exposiciones previas

Exposiciones finales

4. ESTUDIOS DE TOXICIDAD SUBAGUDA: INHIBICIÓN DEL FOTOTACTISMO

Distribución de larvas de *Artemia*

Ensayos para determinación de la capacidad fototáctica

5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA
2. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL FOTOTACTISMO
 - 2.1 Determinación del número de larvas de Artemia para los ensayos
 - 2.2 Exposiciones a los diferentes biocidas ensayados

V. DISCUSIÓN

1. TOXICIDAD AGUDA
2. FOTOTACTISMO

VI. CONCLUSIONES

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

I. INTRODUCCIÓN

1.1 ESTADO ACTUAL DE LA CONTAMINACIÓN DE AGUAS MARINAS

Durante siglos el océano ha podido soportar la contaminación natural y actuación de la sociedad humana sin sufrir grandes modificaciones, pero desde inicio del siglo XX las actividades humanas se han incrementado alcanzando tal nivel que pueden perturbar gravemente los ciclos vitales del ambiente marino/costero y poner en peligro toda su diversidad biológica. El término “contaminación de los sistemas acuáticos”, en general, abarca efectos nocivos ocasionados por el hombre mediante acciones como son los vertidos de sustancias tóxicas y/o radiactivas, de desechos sólidos y dispersos, etc.

En las últimas décadas ha habido un desarrollo constante de las industrias, del turismo y de urbanización masiva en las orillas de los ríos y los mares, así como de lugares antes casi despoblados. Todas estas actividades han aumentado considerablemente el nivel de contaminación del sistema hidrográfico/fluvial y de las costas marinas. En cuanto a los penachos de aguas contaminadas procedentes de los ríos europeos y de los focos costeros, estos son una amenaza constante para las comunidades marinas y costeras, también para las actividades de pesca, acuicultura, turismo en todo el litoral de Europa. Por ejemplo, cualquier río de gran área metropolitana carece de actividad piscícola y algunos índices de contaminación de muchos ríos son muy altos. Este fenómeno trae consigo la contaminación del medio ambiente marino, con la simplificación de toda la estructura del ecosistema. En el nivel individual, las sustancias tóxicas cambian la composición química de la célula, los procesos de respiración, disminuyen el nivel del crecimiento y de la reproducción, aumentan el nivel de la mutación y de las formas patógenas y cancerígenas, cambian el tamaño de la célula y destruyen la posibilidad del animal para orientarse en el espacio.

Por todo ello, la investigación de los ecosistemas marinos y de estuario debe incluir, entre otras, la detección de las fuentes de la contaminación, el estudio de las consecuencias negativas de la contaminación del ecosistema y el estudio de las relaciones causa – efecto entre los niveles de la acumulación de los productos contaminantes y los cambios ecológicos.

1.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA DESALINIZACIÓN

La capacidad total instalada en todo el mundo es de unas 26hm³/día, de los cuales 14hm³/día corresponden a la desalación de agua de mar y 12hm³/día a aguas salobres. El peso de Oriente Medio es muy importante todavía en la industria de la desalinización debido a que representa el 61% del total de aguas desaladas a nivel mundial. Arabia Saudita es el primer país en cuanto a capacidad desaladora (24.4%), seguido de cerca por los Emiratos Árabes y cinco países árabes más, Estados Unidos de Norteamérica (13%), la antigua URSS y España (5%). Si hablamos del número de unidades instaladas, el primer lugar lo ocupa Estados Unidos de América, ya que tienen plantas de pequeño tamaño en comparación con las plantas de Oriente Medio, y Arabia Saudita ocupa el segundo lugar.

En cuanto a las tecnologías empleadas para el proceso de desalación, las de destilación suponen el 52%, las de ósmosis inversa un 38%, y el resto (12%) es principalmente debido a la electrodiálisis.

1.3 SITUACIÓN ACTUAL DE LA DESALINIZACIÓN EN MÉXICO

Se estima que para los próximos años nuestro país tendrá una baja disponibilidad de agua dulce (entre 1.000 y 5.000m³ anuales por persona, es decir, aproximadamente de 3 a 15m³ diarios), de ahí que el conocimiento y la puesta en marcha de técnicas para desalar agua de mar resulten de particular importancia. Sin embargo, el problema no se resuelve únicamente con importar grandes y costosos equipos del extranjero, sino que resulta imprescindible la capacitación del personal idóneo a diferentes niveles de organización.

A pesar de que en diversos estados funcionan plantas desaladoras, un ejemplo de la situación por la que atraviesan las plantas en México es el caso de Quintana Roo. En este estado hay plantas de ósmosis inversa, como en Xcalak, cerca de Chetumal e Isla Convoy que prácticamente están abandonadas, ya sea por falta de refacciones (en la actualidad para este proceso más del 50% del equipo es de importación), o porque realmente no hace falta agua en las comunidades donde se instalaron.

México cuenta con una capacidad instalada de 67.487m³/día (781.1L/s), el 31% no opera, por los altos costos de mantenimiento, refacciones de importación y personal calificado.

Según el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA) existen en México 320 sitios donde están instaladas desaladoras, y en éstos hay 435 plantas. El estado con el mayor número de desaladoras es Quintana Roo, con 124 unidades; le sigue Baja California Sur, con 71. Este último cuenta con la planta municipal más grande del país, en los Cabos, que produce 200L/s de agua potable (Fuentes M., 2007).

El proceso más utilizado en México es la ósmosis inversa. El 53% de las plantas desaladoras son para uso turístico con una capacidad instalada de 26,942m³/día, 35% para uso municipal con una capacidad instalada de 22,143m³/día y el 12% son para uso industrial con una capacidad instalada de 18,403m³/día.

1.4 FUNDAMENTOS DE LA DESALINIZACIÓN DE AGUA

El proceso de desalinización de agua se realiza por medio de distintas tecnologías que en su conjunto han conseguido ponerse en práctica a lo largo de casi todas las zonas costeras y suministrar agua para un sinnúmero de necesidades.

Desde el punto de vista de la tecnología, no existe alguna mejor que las otras y desde el punto de vista económico, cualquiera de las distintas opciones suele ser más cara que cualquiera de los medios habituales de suministro de agua (pozos, embalses, redes de distribución, etc.).

Sin embargo, una parte de las actividades humanas se concentran en lugares donde no existe una alternativa a la desalinización lo que conlleva la aceptación del marco técnico económico de alguno de los procesos de desalación.

La selección dependerá de las condiciones locales, de la disponibilidad de recursos, energía, de la calidad del agua o del soporte tecnológico. De hecho, la capacidad instalada a nivel mundial supera los 40 millones de m³/día a lo largo de no menos de 100 países y utilizando alguna de las siguientes tecnologías:

Procesos de entidad mayor

- Destilación Multi – Stage Flash (MSF)
- Destilación Múltiple Efecto (MED)
- Compresión de vapor (CV)
- Electrodialisis
- Osmosis Inversa (OI)

Procesos de entidad menor

- Congelación
- Destilación por membranas
- Destilación solar

1.5 TECNOLOGÍAS EMPLEADAS EN LA DESALINIZACIÓN

Existen diferentes tecnologías para llevar a cabo el proceso e la desalación del agua marina o agua salobre, y dichas tecnologías se describen a continuación:

1.5.1 Destilación Multi-Stage Flash (MSF):

Este proceso consiste en evaporar el agua salada para conseguir vapor que no contiene sales (éstas son volátiles a partir de 300°C); el vapor se condensa posteriormente en el interior o exterior de los tubos de la instalación. Los sistemas de desalación suelen funcionar por debajo de la presión atmosférica, por lo que necesitan un sistema de vacío (bombas o eyectores), además de extracción del aire y gases no condensables. La utilización de una cámara flash permite una evaporación súbita (y por lo tanto de carácter irreversible) previa a su posterior condensación. Este proceso se repite a lo largo de una serie de etapas en las que la presión va disminuyendo según las distintas condiciones (Fig. 1).

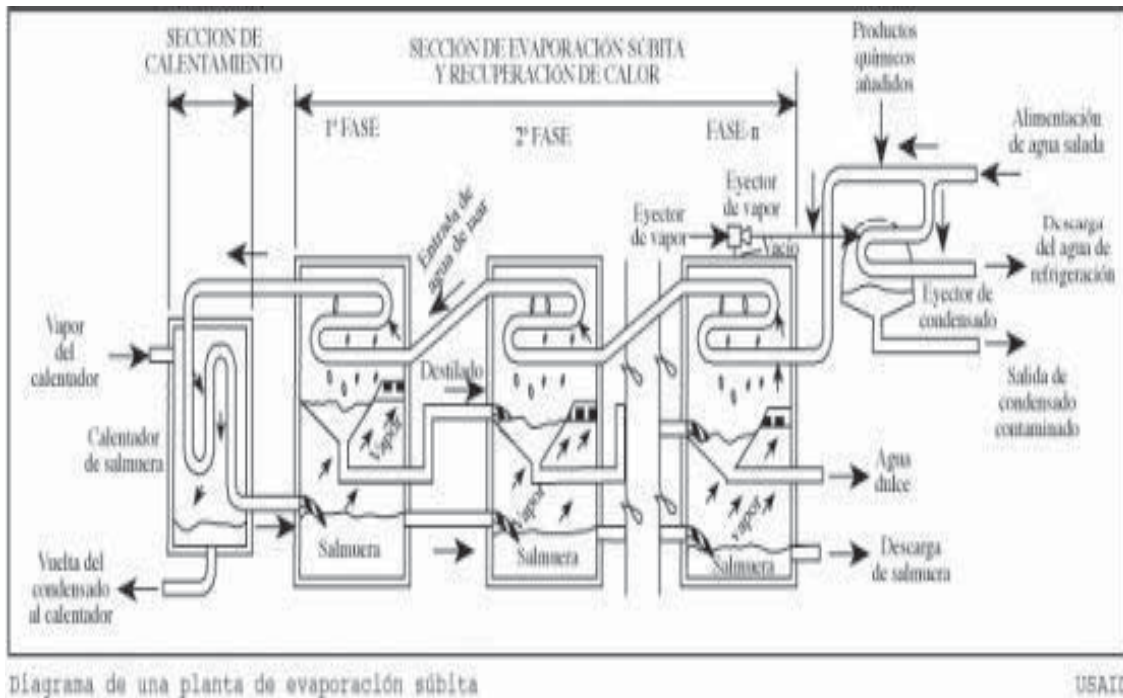


Fig.1 Diagrama de una planta de destilación multi-stage flash (MSF)

1.5.2 Destilación de Múltiple Efecto (MED): La evaporación se produce de forma natural en una cara de los tubos de un intercambiador aprovechando el calor latente desprendido por la condensación del vapor en la otra cara del mismo. Una planta MED tiene varias etapas conectadas en serie a diferentes presiones de operación, dichos efectos sucesivos tienen cada vez un punto de ebullición más bajo por el efecto de dicha presión. Esto permite que el agua de alimentación experimente múltiples ebulliciones, en los sucesivos efectos, sin necesidad de recurrir a calor adicional, a partir del primer efecto. El agua salada se transfiere luego al efecto siguiente para sufrir una evaporación y el ciclo se repite, utilizando el vapor generado en cada efecto. La primera etapa se nutre de vapor externo de un sistema recuperativo, una turbina de contrapresión (o extracción de una de condensación). Un condensador final recoge el agua dulce en la última etapa precalentado el agua de aportación al sistema (Fig. 2).

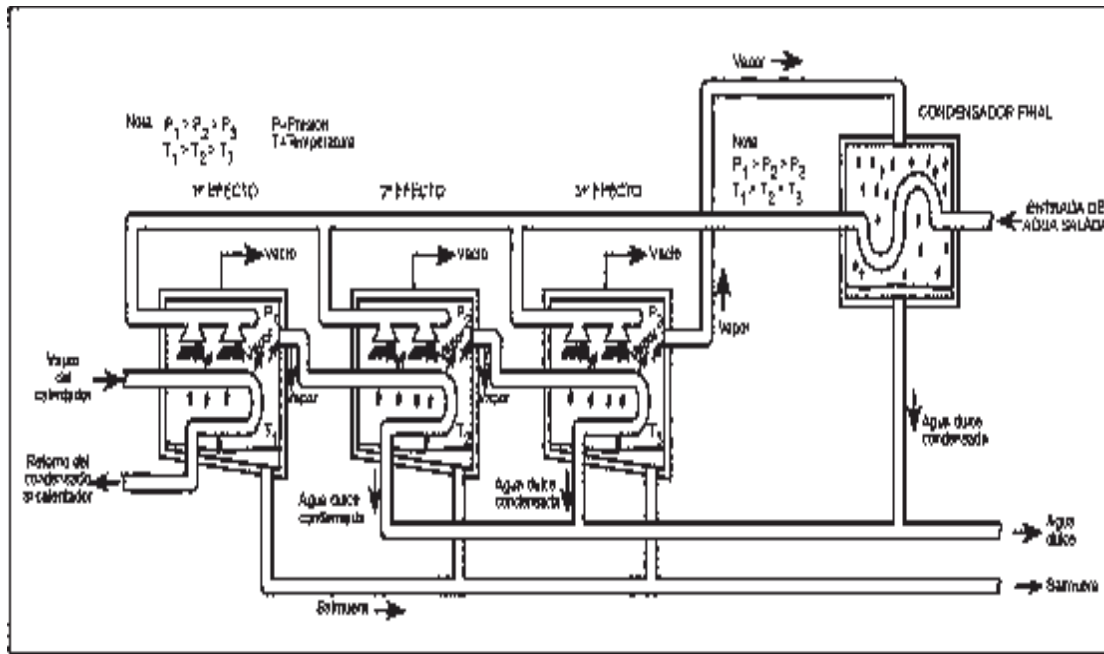


Diagrama de una planta multiefecto con tubos horizontales USAID

Fig. 2 Diagrama de una planta de destilación multi-efecto con tubos horizontales (MED)

1.5.3 Sistema de Compresión de Vapor:

Este sistema utiliza una fuente de energía térmica diferente llamados compresores térmicos (o termocompresores), que consumen vapor de media presión proveniente de la planta de producción eléctrica (si se cuenta con una planta dual, sino sería de un vapor de proceso obtenido expresamente para ello), y que succiona parte del vapor generado en la última etapa a muy baja presión, comprimiéndose y dando lugar a un vapor de presión intermedia a las anteriores adecuado para aportarse a la 1ª etapa, que es la única que consume energía en el proceso (Fig. 3).

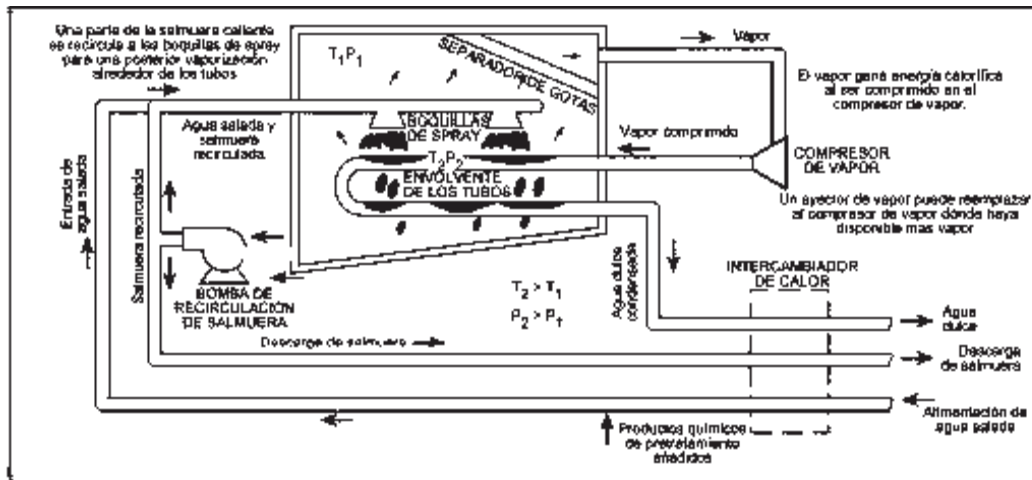


Diagrama de una unidad de compresión mecánica de vapor USAID

Fig. 3 Diagrama de una planta de compresión mecánica de vapor

1.5.4 Osmosis Inversa:

Se lleva a cabo mediante la aplicación de una presión superior a la presión osmótica que hace que se mezclen el agua y la sal. Esa presión se realiza a través de unas membranas permeables que permiten que el agua fluya en un sentido mientras que la salmuera lo haga en el contrario.

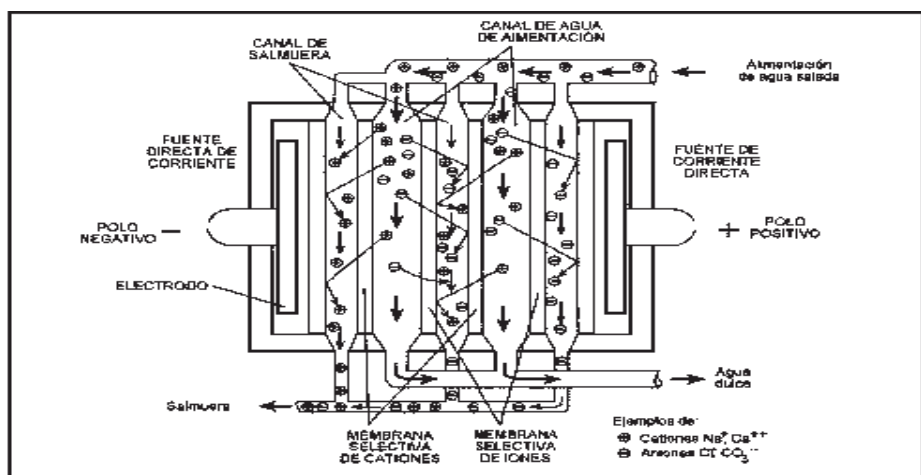
Algunas membranas de osmosis inversa rechazan hasta 99% de todos los sólidos iónicos y tienen comúnmente un peso molecular en el rango de 100 a 300 daltons para los químicos orgánicos (Fig. 4)



Fig. 4 Diagrama representativo del método de osmosis inversa

1.5.5 Electrodiálisis:

Se basa en la carga positiva o negativa de muchos de los iones de las sales disueltas y en la capacidad de migrar hacia su correspondiente electrodo. Los iones pasan a través de unas membranas permeables situadas de forma estratégica para garantizar que el proceso no sea reversible (Fig. 5).



Movimiento de iones en el proceso de electrodiálisis
USAID

Fig. 5 Diagrama representativo del proceso de electrodiálisis.

1.5.6 Destilación por membranas:

Este proceso calienta el agua hasta conseguir vapor que se pone en contacto con una membrana capaz de dejar pasar el vapor pero no el agua. El vapor filtrado está libre de sales y se condensa a lo largo de una superficie enfriada por la propia agua de mar.

1.5.7 Destilación solar:

Constituyen el sistema más antiguo de desalinización y se basa en la duplicación del proceso hidrológico natural. El sol calienta un recipiente lleno de agua salina y conforme el aire se calienta, se va humidificando hasta su saturación. Este aire saturado se pone en contacto con una superficie fría (normalmente la propia cubierta de vidrio del recipiente) y condensa una cierta cantidad de agua (Fig. 6).

El proceso no recupera calor y necesita un aporte masivo de energía, que cuando es solar se puede considerar gratis.

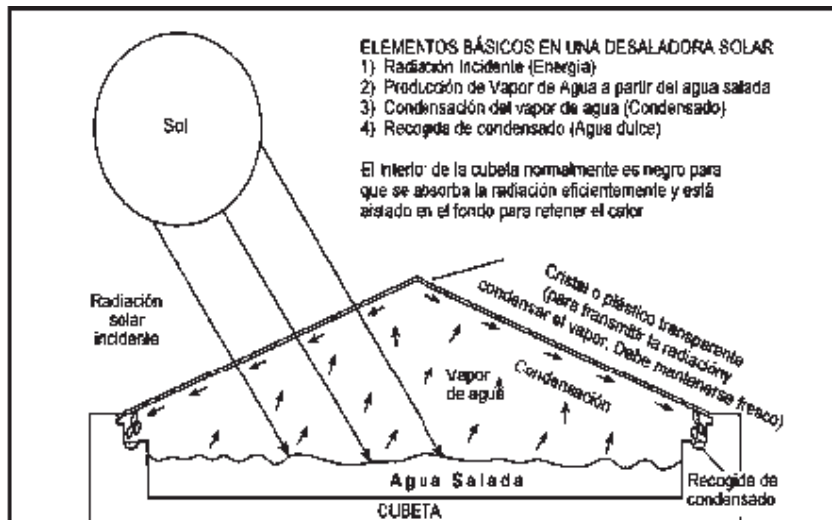


Fig. 6 Diagrama representativo del proceso de destilación solar

1.6 INCONVENIENTES DE LA DESALINIZACIÓN

- En el proceso de extracción de la sal del agua de mar, se producen residuos salinos que una vez vertidos al mar perjudican a la flora marina al aumentar la salinidad de las aguas.
- Las complejas instalaciones de ósmosis inversa requieren un gran consumo de electricidad.
- Las desalinizadoras se instalarían en lugares no ocupados por las urbanizaciones turísticas.
- Como fábricas que son, tienen una vida limitada.
- El agua desalada, al parecer. Podría perjudicar a la agricultura. Los cítricos, por ejemplo, tan abundantes en la zona de Valencia y Murcia, en España, son muy sensibles a los minerales que contiene el agua desalada.
- Habría que realizar nuevas y costosas obras de infraestructura para trasladar el agua desalada a las zonas donde es necesaria.

1.7 VENTAJAS DE LA DESALINIZACIÓN

- Según algunas fuentes, supone el 3% de ocupación de terreno y el 3% de desplazamiento de tierras frente al trasvase.
- El sistema de desalinización consumiría un 30% menos de energía que la requerida para trasladar el agua.

- Podrían utilizarse energías renovables para el funcionamiento de las desaladoras, en zonas donde el sol y/o el viento abundan.

1.8 COMPUESTOS CONTAMINANTES MÁS FRECUENTES EN LA DESALACIÓN

La posible presencia de determinados contaminantes que pueden estar presentes en los efluentes provenientes de la instalación, puesta en marcha y mantenimiento de plantas desaladoras de agua marina crean un riesgo medioambiental por el uso de las aguas a nivel agrícola, industrial, o incluso para consumo humano. Estos contaminantes pueden llegar a provocar severos daños a la fauna acuática presente en dichos ecosistemas, por lo que resultaría fundamental mantener un protocolo de control para evitar la aparición de daños sobre estos organismos.

1.8.1 Grupos principales de sustancias utilizadas en el proceso de desalación.

- Inhibidores de la corrosión y desincrustantes.
- Coagulantes a base de hierro.
- Coagulantes a base de aluminio.
- Floculantes. Eliminación de partículas en suspensión y coloides.
- Medios filtrantes y adsorbentes.
- Regeneradores de resinas de intercambio iónico.
- Desinfectantes y oxidantes.
- Agentes reductores para la eliminación de exceso de oxidante.
- Formación de cloraminas, tratamientos bacteriostáticos y alguicidas.
- Correctores de pH y de la dureza.
- Desnitrificantes
- Anticaries.

En la tabla 1 se muestran algunas de las sustancias empleadas en el proceso de desalación.

LEYENDA

P: Planta de tratamiento (ETAP o desaladora).

U: Proceso de tratamiento independiente (unitario) e instalación interior.

L: Limpieza de superficies en contacto con el agua.

FUNCION	SUSTANCIA	LUGAR
Inhibidores de la corrosión y desincrustantes	Ácido fosfórico	P
	Polifosfato de sodio y calcio,	
	Pirofosfato tetrapotásico	
Coagulantes a base de hierro / aluminio	Sulfato de aluminio / hierro (III),	P
	Cloruro de aluminio / hierro	
Floculantes	Almidones modificados, Poliacrilamidas, Poliaminas	P
Medios filtrantes y absorbentes	Bentonita,	P, U
	Arena y grava	P, U
	Carbón activado	P
Regeneradores de resinas de intercambio iónico	Cloruro de sodio	Resinas de intercambio
Desnitrificación	Ácido acético, etanol, metanol	P
Desinfectantes y oxidantes	Ácido clorhídrico,	P, Resina de intercambio
	Hipoclorito de sodio / calcio,	P, U, L
	Permanganato de potasio,	P
	Oxígeno	P, Captación, Conducción
	Peroxodisulfato de sodio	L
Formación de cloraminas, bacteriostáticos y alguicidas	Amoniaco,	P
	Sulfato de amonio,	P
	Sulfato de cobre	L

Tabla 1. Compuestos empleados en el proceso de desalinización, función y ubicación donde son empleados en el proceso.

1.9 BIOCIDAS

Los biocidas quedan definidos como sustancias químicas, sintéticas, naturales de origen biológico, o de origen físico, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier microorganismo considerado nocivo para el hombre. Estas sustancias debido a su amplio ámbito de actuación deben considerarse como posibles contaminantes de los efluentes, también provenientes de la instalación.

1.9.1 Condiciones de un buen biocida

- Debe tener un amplio espectro de actividad, es decir, debe cubrir una amplia gama de microorganismos (bacterias, virus y hongos).
- Efecto a baja concentración, mientras más baja es la dosis, más económico resulta el tratamiento.
- Efectivo en un amplio rango de pH.
- Soluble en agua.
- Compatible con otras especies químicas en el medio.
- Alta persistencia, debe ser efectivo a través del tiempo.
- Fácil de neutralizar, debe poseer mecanismos desactivadores para su posterior neutralización.
- Baja toxicidad humana, no debe ser perjudicial en su manipulación, segura por parte del operador.

1.9.2 Clasificación de biocida de acuerdo a su origen

Se pueden presentar de tres formas:

Físico: Fuentes de radiación de alta energía (luz UV) que oxidan la pared proteica y prácticamente queman al microorganismo.

Biológicos: Sustancias creadas por organismos superiores para autodefensa, generalmente son de tipo proteico y se denominan enzimas.

Químicos: Pueden ser a su vez inorgánicos o de síntesis orgánica.

1.9.3 Mecanismo de acción de los biocidas

Los biocidas tienen como uno de los principales mecanismos de acción actuar a nivel de membrana celular del microorganismo, penetrándola y destruyendo los sistemas que permiten vivir al microorganismo. El biocida provoca la lisis de la pared proteica o lipoproteica del organismo y penetra en su interior interrumpiendo las reacciones bioquímicas que sustentan la vida en el organismo.

1.9.3.1 Agentes oxidantes

A) Aldehídos

Los representantes de esta categoría son el formaldehído y glutaraldehído, biocidas de amplio espectro capaces incluso de destruir las esporas bacterianas más resistentes. Son productos solubles en agua pero vaporizan rápidamente, provocando así un fuerte olor penetrante y desagradable. Además, el formaldehído es un potente carcinógeno, existiendo sobre él severas restricciones, establecidas por la Occupational Safety & Health Administration (OSHA), en cuanto a la permisibilidad de exposición en los lugares de trabajo.

El glutaraldehído resultó ser una buena alternativa para realizar esterilización en frío de instrumentación quirúrgica, frente a los tratamientos por calor mediante autoclave. Sin embargo, su eficacia requiere soluciones de 20.000-30.000ppm y exposiciones prolongadas de 10 horas o más. Además tiene gran tendencia a sensibilizar a los manipuladores, en una relación de 1:8 personas expuestas y que desarrollan algún fenómeno alérgico. Hoy en día se utiliza como desinfectante medioambiental mediante rociado a concentraciones de aproximadamente 1.500ppm, aunque de todos es conocido su gran persistencia en el medio acuático de tal forma que en muchos municipios estadounidenses no permiten su vertido a los desagües. Aunque sus vapores deben ser controlados para evitar exposiciones excesivas frente a los trabajadores, su bajo costo de fabricación y el uso continuado hacen de él uno de los desinfectantes más vendidos.

B) Alcoholes

El isopropanol y etanol tienen una larga historia como ingredientes comunes de preparados desinfectantes, tanto de uso médico como productos de consumo. Los alcoholes son solventes, y por tanto su mecanismo de actuación sobre microorganismos se basa en su capacidad de disolver su capa exterior. Actúan rápidamente, pero tienen la desventaja de su pronta evaporación, sobre todo cuando se aplican sobre superficies. Para ser eficaces requieren estar presentes en los formulados a concentraciones altas, del orden del 15-70%, y su atributo principal es la velocidad de disolución de bacterias y virus, fundamentalmente de aquellos que poseen una cubierta lipídica (por ejemplo *Mycobacterium*). Sin embargo, esta capacidad presenta desventajas en diversas superficies, ya que como solventes atacan a plásticos y polímeros, los cuales se degradan rápidamente.

A pesar de ello siguen siendo muy populares en su uso por su rapidez de acción, aunque disten mucho de ser desinfectantes ideales por su evaporación y por no dejar ninguna protección residual.

C) Derivados Halogenados: Yodo, Cloro, Bromo

Los derivados halogenados poseen una amplia historia como agentes antimicrobiales, de tal forma que los últimos estudios estadísticos demuestran que los átomos de cloro y bromo están presentes en la mayoría de las configuraciones de los biocidas actuales. Mientras que el cloro y bromo son utilizados para la desinfección de aguas, el yodo es incorporado generalmente a los formulados antisépticos para la desinfección de heridas.

El cloro es un biocida de amplio espectro barato y eficaz. Que se utiliza en disolución a 500-5000ppm para desinfección medioambiental. El hipoclorito sódico, en contacto con el agua, pasa a la forma de ácido hipocloroso, que es la forma más activa para su actuación como biocida. El problema fundamental que surge con la utilización de este compuesto es que, siendo susceptibles todas las formas vivas a su acción oxidante, también lo son muchas superficies donde se aplica, generando fenómenos de corrosión importantes, fundamentalmente en elementos metálicos. El ácido hipocloroso trabaja en rangos muy estrechos de pH, fuera del cual deja de ser activo, se degrada por

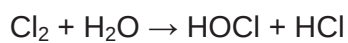
la acción de los rayos ultravioleta y reacciona con gran número de moléculas orgánicas, generando los llamados derivados de la desinfección o DBP. Algunos de éstos son altamente carcinógenos, y por ello el uso del cloro, fundamentalmente en procesos industriales, está bajo una crítica revisión en toda Europa.

C-1) Cloro

El cloro es posiblemente el biocida industrial más usado hoy en día. Se utilizó durante mucho tiempo para la desinfección de los abastecimientos de agua domésticos y para el retiro del sabor y los olores del agua. La cantidad de cloro que necesita ser agregada a un sistema de agua viene determinada por varios factores, a saber: demanda de cloro, tiempo de contacto, pH y temperatura del agua, volumen de agua y cantidad de cloro que se pierde con la aireación.

Cuando el cloro gaseoso se incorpora a un abastecimiento de agua se hidroliza para formar ácido hipocloroso y clorhídrico. Es éste último el que determina la actividad biocida.

Este proceso ocurre según la reacción siguiente:



El ácido clorhídrico es el responsable de las reacciones de oxidación del citoplasma de los microorganismos, después de la difusión a través de las paredes de la célula. El cloro entorpece la producción de ATP (Adenosín trifosfato), un compuesto esencial para la respiración de los microorganismos. Las bacterias que están presentes en el agua morirán como consecuencia de los problemas de respiración experimentados, causados por la actividad del cloro.

La cantidad de cloro que necesita ser agregada para el control del crecimiento bacteriano viene determinada por el pH. Cuanto más alto es el pH, más cloro es necesario para matar a las bacterias indeseadas en un sistema de

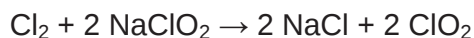
agua. Cuando los valores de pH están dentro de una gama de 8 a 9, se deben agregar 0.4ppm de cloro. Cuando los valores de pH están dentro de una gama de 9 a 10, se deben agregar 0.8ppm de cloro.

C-2) Dióxido de cloro

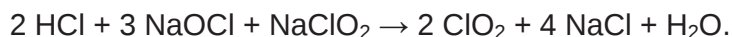
Los átomos de cloro y sus óxidos pueden generarse a través del uso de dióxido de cloro, que es un poderoso desinfectante y esterilizante. Sin embargo, una vez disuelto, los átomos activos de dióxido de cloro tienen una vida muy corta, y para que el formulado tenga efecto debe ser preparado *in situ* justo antes de su utilización. Por otra parte, es sumamente corrosivo para metales, caucho, plásticos, etc., y sus vapores pueden ser letales. Últimamente se vienen comercializando mezclas con estabilizadores para solventar este problema, pero son mucho menos eficaces y, además ya están comercializados productos a partir de cloratos para el mismo propósito.

El dióxido de cloro es un biocida oxidante activo, eso lo hace ser el más aplicado y aún más debido al hecho de que este tiene efectos menos perjudiciales para el ambiente y la salud humana que el cloro. No forma ácidos hipoclorosos en agua; existe como dióxido de cloro disuelto, un compuesto que es un biocida más reactivo en gamas más altas de pH.

El dióxido del cloro es un gas explosivo, y por lo tanto tiene que ser producido o ser generado in-situ, por medio de las reacciones siguientes:



ó



C-3) Isocianatos de cloro

Estos son los compuestos organo-clorados que en hidrólisis dan el ácido hipocloroso y ácido cianhídrico en agua. El ácido cianhídrico reduce la pérdida de cloro debido a las reacciones fotoquímicas con la luz UV, de modo que más ácido clorhídrico se origina y la acción biocida se ve realzada.

C-4) Hipoclorito

El hipoclorito es la sal del ácido hipocloroso. Se formula en varios tipos de formas. El hipoclorito se aplica generalmente como el hipoclorito de sodio (NaClO) e hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$). Estos compuestos se pueden aplicar como biocidas. Funcionan de la misma manera que el cloro, aunque son menos eficaces.

En resumen, la característica de este tipo de formulaciones basadas en la utilización del cloro es su alto poder de corrosión y la alta incidencia de alteraciones de piel e irritación de ojos que provocan, además de procesos de resistencia bacteriana cuando son utilizados, de forma continua, durante largos periodos de tiempo.

D) Peróxidos/Donantes de Oxígeno

El oxígeno, fundamentalmente en aquellas formas reactivas en agua, es un poderoso agente antimicrobial, y por ello el peróxido de hidrógeno ha llegado a ser el antiséptico de elección frente a heridas durante muchos años. También se ha usado como desinfectante de superficies, pero tiene una vida muy corta en su forma de aplicación a concentraciones del 3 %, o 30.000ppm. Cuando se intentó aplicar a concentraciones del 35 % resultó ser muy corrosivo, se evaporaba muy rápido y tenía propiedades carcinógenas. Su uso como agente blanqueador y decolorante para la mayoría de tejidos y polímeros está muy extendido, y la OSHA ha establecido los límites de exposición para los lugares de trabajo. Los vapores de peróxido de hidrógeno se usan como sistema de esterilización, y de hecho Johnson & Johnson ha desarrollado cámaras de esterilización hospitalaria bajo este principio.

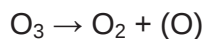
Otros potentes oxidantes, como el ácido peroxiacético o el óxido de etileno están siendo utilizados cada vez más como esterilizantes en frío, aunque cada vez existen mayor número de datos que indican una alta corrosividad de sus vapores y su gran poder letal cuando éstos son inhalados, si bien el ácido peroxiacético en concreto no llega a ser tan corrosivo cuando

se aplica en forma de líquido sobre instrumentación quirúrgica, por lo que podría suplantar al glutaraldehído si su tendencia a evaporarse rápidamente no restringe su ámbito de utilización.

D-1) Ozono

El ozono es naturalmente inestable. Puede ser utilizado como agente oxidante de gran alcance, cuando se genera en un reactor. Como un biocida él actúa de la misma manera que el cloro; dificulta la formación del ATP, de modo que la respiración de la célula de los microorganismos se hace difícil. Durante la oxidación con ozono, las bacterias mueren generalmente por pérdida del citoplasma que sostiene la vida.

Mientras que el proceso de la oxidación ocurre, el ozono se divide en oxígeno diatómico y un átomo de oxígeno, que se pierde durante la reacción con los líquidos de la célula de las bacterias:



Algunos de los factores que determinan la cantidad de ozono requerida durante la oxidación son: pH, temperatura, compuestos orgánicos, solventes, y productos acumulados de la reacción.

El gas ozono se utiliza como desinfectante de aguas, tanto de uso recreativo como para agua potable. Es sumamente eficaz contra toda forma de microorganismo, incluso contra esporas y parásitos del género *Cryptosporidium*. Sin embargo, resulta ser un potente tóxico, con una vida media muy corta en el agua y no deja efecto residual. Es capaz de degradar todo tipo de polímeros y metales por contacto, y la OSHA obliga a unos requisitos muy estrictos de cara a la exposición de los manipuladores de esta sustancia.

1.9.3.2 Agentes reductores

A) Compuestos Fenólicos

La utilización de los compuestos fenólicos para su uso como desinfectantes provienen de principios de siglo, cuando estaba vigente la

aplicación de productos derivados del pino y alquitrán de hulla, y su utilización llegó a ser tal que el fenol fue utilizado como patrón para medir la eficacia antimicrobial, pese a conocer las características carcinógenas de él. Hoy en día, la utilización de extractos fenólicos de fuentes naturales prácticamente ha desaparecido, y en su lugar son ampliamente utilizados los compuestos fenólico-clorados sintetizados por la industria, ya que son mucho más baratos de producir, tienen mayor duración y la mayoría son menos tóxicos que los anteriores. Así, por ejemplo, el hexaclorofeno fue un producto de amplia utilización hasta que sus propiedades neurotóxicas fueron reconocidas, prohibiéndose su utilización por Food and Drug Administration (FDA).

Hoy en día, los compuestos fenólico-clorados son de uso común, usándose a concentraciones de 500-1000ppm, normalmente mediante mezclas con alcoholes como desinfectantes hospitalarios. Tiene un olor característico y son capaces de degradar plásticos y otras superficies, pero pueden mezclarse con aldehídos para hacer los denominados como *esporocidas de alto nivel*. Aquellos que abarcan un amplio espectro de actuación poseen características tóxicas, además de poseer la capacidad de interacción con compuestos orgánicos en medios acuáticos y su gran persistencia medioambiental, de tal forma que hoy en día existe una gran presión para limitar su uso e incluso llegar a una prohibición total.

B) Fenoles tratados con cloro

Los fenoles clorados, a diferencia de los biocidas oxidantes, no tienen un efecto sobre la respiración de los microorganismos. Sin embargo ellos inhiben el crecimiento. Los fenoles clorados primero se adsorben a la pared celular de los microorganismos por interacción con enlaces de hidrógeno. Después de la adsorción por la pared celular ellos difundirán dentro de la célula donde quedarán en suspensión y precipitarán las proteínas. Debido a este mecanismo el crecimiento de los microorganismos es inhibido.

C) Metales Pesados

Todos los metales pesados son tóxicos para la mayoría de las formas de vida, y esta característica ha sido aprovechada tradicionalmente para su uso como desinfectantes. Así, compuestos como el zinc, plata, mercurio, arsénico, cobre, boro o estaño han ido siendo incorporados de diferente manera a los formulados, cada vez con mayor grado de sofisticación. A menudo se utilizan sales cúpricas como alguicidas, y el cobre también ha sido utilizado para limitar los niveles bacterianos en cañerías. Compuestos a partir de plata se aplican para la destrucción de bacterias y virus, y cartuchos con contenido de plata están disponibles para la medición en arroyos, piscinas y sistemas cerrados de torres de refrigeración. Las sales de boro son utilizadas para limitar la colonización de bacterias en depósitos de combustible de grandes naves y en los depósitos Diesel de vehículos como trenes.

Es probable que su amplia utilización se vea progresivamente cuestionada ya que, aunque son compuestos baratos y eficaces, su alta toxicidad y gran persistencia en el medioambiente hacen de ellos sustancias peligrosas, y ya existen movimientos para prohibir definitivamente sus usos en muchas aplicaciones. Además, existen bacterias que desarrollan resistencias a los iones metálicos cuando se ven expuestas de forma constante, y así se conocen pseudomonas plata-resistentes por la desinfección reiterada de agua con plata.

D) Compuestos de Amonio Cuaternario

Genéricamente denominados como QUATs, son compuestos solubles en agua de amplia utilización como desinfectantes. Su dilución se practica en el mismo lugar de aplicación y su uso representa cerca del 50 % de la utilización de desinfectantes en el ámbito mundial. Como características principales se deben destacar la prácticamente ausencia de olor y que, cuando se diluyen a concentraciones normales de uso, en torno a 700-2000ppm, resultan ser bastante seguras para los usuarios.

Su mecanismo de acción está basado en su capacidad para disolver las capas exteriores de muchos agentes patógenos, si bien su eficacia es limitada,

por lo que han sido considerados como desinfectantes de bajo nivel. Además, su poder corrosivo sobre algunos polímeros permite el crecimiento de ciertas bacterias y una tendencia de algunas de ellas a desarrollar fenómenos de resistencia, caso del *Staphylococcus aureus* y de *Pseudomonas*.

Los QUATs de nueva generación han podido polimerizarse en formas sólidas, lo que representa una alternativa en el grupo de biocidas de contacto. Sin embargo, resultan excesivamente caros, no desarrollan una mayor potencia comparados con los anteriores y sus moléculas se lixivian fácilmente en el medioambiente.

D-1) Sales cuaternarias de amonio

Las sales cuaternarias de amonio son los productos químicos tensoactivos que consisten generalmente en un átomo de nitrógeno, rodeados por los grupos substitutivos que contienen de ocho a veinticinco átomos de carbón en cuatro perspectivas del átomo de nitrógeno.

Estos compuestos son generalmente los más eficaces contra bacterias en gamas alcalinas de pH. Se cargan y enlazarán positivamente a los sitios negativamente cargados en la pared bacteriana de la célula. Estos enlaces electrostáticos causarán a las bacterias tensiones en la pared de la célula. También causan daño al flujo normal de compuestos que sostienen la vida a través de la pared de la célula al paralizarlo, disminuyendo su permeabilidad.

D-2) Aminas

Las aminas son surfactantes que pueden actuar como biocida debido a su capacidad de matar a los microorganismos. Estas pueden potenciar el efecto biocida de los compuestos fenólicos clorados cuando son adicionados al agua.

1.9.4 Grupos y tipos de biocidas de acuerdo a la EPA (Agencia de Protección Ambiental por sus siglas en inglés)

Según la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de febrero de 1998, relativa a la comercialización de biocidas, este grupo queda definido como “sustancias activas y preparados que contienen una o

más sustancias activas, presentados en la forma en que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos”. En su Anexo V, se engloban bajo el epígrafe de Desinfectantes y Biocidas Generales, de los que reconoce 4 grupos y 23 tipos, en el siguiente esquema se muestra parte de su clasificación (Fig. 7)

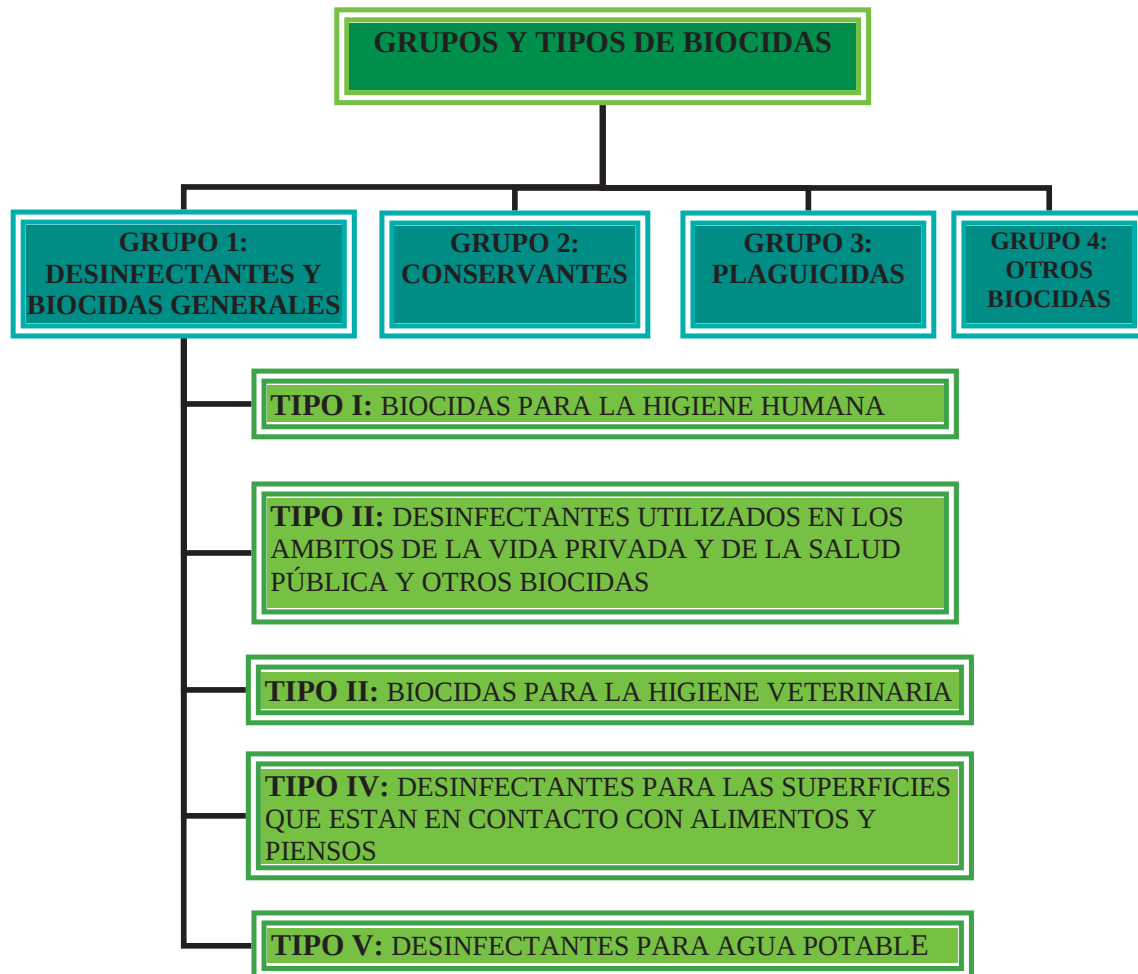


Fig. 7 Clasificación de los grupos y tipos de biocidas de acuerdo a la EPA

GRUPO 1: DESINFECTANTES Y BIOCIDAS GENERALES

Estos tipos de productos excluyen los productos de limpieza que no persiguen un efecto biocida, incluidos los detergentes líquidos, en polvo y similares.

► **TIPO 1: BIOCIDAS PARA LA HIGIENE HUMANA.**

Los productos de este grupo son los biocidas empleados con fines de higiene humana.

► **TIPO 2: DESINFECTANTES UTILIZADOS EN LOS ÁMBITOS DE LA VIDA PRIVADA Y DE LA SALUD PÚBLICA Y OTROS BIOCIDAS.**

Productos empleados para la desinfección del aire, superficies, materiales, equipos y muebles que no se utilicen en contacto directo con alimentos o piensos en zonas de la esfera privada, pública e industrial, incluidos los hospitales, así como los productos empleados como alguicidas. Las zonas de utilización incluyen, entre otras, las piscinas, acuarios, aguas de baño y otras; sistemas de aire acondicionado; paredes y suelos de centros sanitarios y otras instituciones; retretes químicos, aguas residuales, desechos de hospitales, tierra u otros sustratos (en las áreas de juegos).

► **TIPO 3: BIOCIDAS PARA LA HIGIENE VETERINARIA.**

Los productos de este grupo son los biocidas empleados con fines de higiene veterinaria, incluidos los productos empleados en las zonas en que se alojan, mantienen o transportan animales.

► **TIPO 4: DESINFECTANTES PARA LAS SUPERFICIES QUE ESTÁN EN CONTACTO CON ALIMENTOS Y PIENSOS.**

Productos empleados en la desinfección de equipos, recipientes, utensilios para consumo, superficies o tuberías relacionados con la producción, transporte, almacenamiento o consumo de alimentos, piensos o bebidas (incluida el agua potable) para seres humanos o animales.

► **TIPO 5: DESINFECTANTES PARA AGUA POTABLE.**

Productos empleados para la desinfección del agua potable (tanto para seres humanos como para animales).

2. RIESGO AMBIENTAL

Bajo la perspectiva de conseguir, como objetivo principal, identificar los efectos indeseables que un biocida es intrínsecamente capaz de provocar, se incluye en las evaluaciones de biocidas sus efectos sobre el medio ambiente, y así la normativa busca la identificación de peligrosidad sobre el agua (incluso los sedimentos), el aire, la tierra, las especies de la fauna, la flora silvestre y todas las interrelaciones entre ellas, así como las relaciones entre todos ellos y cualquier organismo vivo. Esta declaración de principios se basa en la evaluación del riesgo determinado para el ser humano, los animales y para el medioambiente, y la adopción de las medidas necesarias para la protección del ser humano, los animales y el medioambiente durante el uso normal del biocida y en el caso más desfavorable.

En lo referente a los efectos sobre el medioambiente, la evaluación del riesgo deberá tener en cuenta todo efecto adverso causado por la utilización del biocida en cualquiera de los tres compartimentos medioambientales: aire, suelo y agua (incluidos los sedimentos y la biota). La identificación del peligro potencial se basará en las propiedades y posibles efectos adversos de la sustancia activa y sustancias de posible riesgo presentes en un biocida. Si los resultados obtenidos fueran desfavorables, será necesario efectuar la evaluación de la relación dosis (concentración)-respuesta (efecto), evaluación de la exposición y caracterización del riesgo.

La caracterización del riesgo ambiental que supone la utilización de una determinada sustancia, puede derivar, en general, de las propiedades y efectos de dicha sustancia en su forma activa o del posible riesgo presente en ella, y en particular de:

- Los elementos que indiquen un potencial de bioacumulación.
- Las características de persistencia.
- La forma de la curva toxicidad/tiempo en el ensayo de ecotoxicidad.
- Las indicaciones de otros efectos adversos basadas en los estudios de toxicidad, por ejemplo, clasificación como mutágeno.
- Los datos sobre sustancias de estructura análoga.

- Los efectos endocrinos.

La valoración del posible riesgo toxicológico de un biocida se realiza mediante el estudio de la relación Concentración/Efecto, mediante la obtención de la Concentración Prevista sin Efectos (PNEC), es decir, aquella concentración prevista bajo la cual no se espera efecto adverso ninguno. Esta concentración se calculará aplicando un factor de evaluación a los valores resultantes de los ensayos con organismos, por ejemplo, DL_{50} (dosis letal 50), CL_{50} (concentración letal 50), CE_{50} (concentración eficaz 50), CI_{50} (concentración que produce el 50 % de inhibición de un parámetro dado, por ejemplo, crecimiento, NOEL/C (nivel/concentración sin efecto observado) o LOEL/C (nivel/concentración con mínimo efecto observado).

Un hecho importante a tener en cuenta es lo que se ha denominado como Factor de Evaluación, entendiendo como tal una expresión del grado de incertidumbre en la extrapolación de los datos de un ensayo con un número limitado de especies al medio ambiente real. Por eso, en general, cuanto más amplios sean los datos y mayor la duración de los ensayos, menor será el grado de incertidumbre y la magnitud del factor de evaluación. Para cada compartimiento medioambiental se realizará una evaluación de la exposición para predecir la concentración que sea probable encontrar de cada sustancia activa o de posible riesgo presente en el biocida. Esta concentración se conoce como Concentración Ambiental Prevista (PEC), la cual sólo será determinada en el caso de aquellos compartimentos medioambientales en los que se dan o son razonablemente previsibles emisiones, vertidos, eliminaciones o distribuciones, inclusive cualquier contribución pertinente de material tratado con biocidas.

La PEC se calculará atendiendo a:

- Los datos de exposición medidos de forma adecuada.
- La forma de comercialización del producto.
- El tipo de biocida.
- El método y la tasa de aplicación.

- Las propiedades fisicoquímicas.
- Los productos de degradación/transformación.
- Las rutas probables de llegada a los compartimentos medioambientales y potencial de adsorción y degradación.
- La frecuencia y duración de la exposición.

Siempre que sea posible, y en cada uno de los compartimentos ambientales, la caracterización del riesgo llevará aparejada una comparación de la PEC con la PNEC, de manera que pueda obtenerse una relación PEC/PNEC. De forma general se puede indicar que si el resultado de dicho cociente es inferior o igual a 1, la decisión por parte de las autoridades puede ser ya tomada positivamente, sin necesidad de mayor información. Si, por el contrario, el resultado fuera superior a 1, requeriría mayor información con el desarrollo de más pruebas, además de medidas de reducción de riesgo e, incluso, la no autorización para su uso.

2.1 IMPACTO DE LA DESALINIZACIÓN

Los procesos básicos más empleados para la extracción de sal del agua son dos: por destilación y por ósmosis inversa.

El impacto que tienen ambos procesos en el medio marino es parecido y resulta principalmente del vertido de las aguas residuales, aunque también existe cierto impacto derivado del proceso de captación de aguas.

Las aguas residuales resultantes de la desalinización presentan un contenido mayor de sales, y al ser descargadas al medio acuático a través de tuberías ocasionan que se presenten diferencias de temperatura, de pH, de alcalinidad y además de contener sustancias químicas utilizadas durante el proceso de depuración. En el caso de las plantas que funcionan por destilación el vertido representa de 8 a 10 veces el volumen de agua depurado, mientras que en plantas de ósmosis inversa el volumen residual es menor que en las anteriores (2.5 a 3 veces el volumen depurado) pero el vertido tiene un contenido en sales mucho mayor.

En ambos casos hay que añadir el vertido de productos químicos (biocidas, anti-incrustantes y anti-espumantes) resultado del tratamiento del agua, así como también los vertidos puntuales que resultan del limpiado de las

membranas y que constituyen aportes muy concentrados de sólidos en suspensión y detergentes.

Tradicionalmente se ha considerado que el impacto químico del proceso de ósmosis inversa era despreciable por verter a concentraciones muy bajas. Sin embargo muchos de los componentes de los vertidos tienen un impacto demostrado sobre el medio marino y, en algunos casos (por ejemplo los metales) no tanto por su concentración sino por la carga que representan.

2.2 PELIGROSIDAD DE LOS VERTIDOS DE AGUAS CONTAMINADAS

Tomando como ejemplo las consideraciones realizadas por el Code of Federal Regulations (CFR), todo vertido de agua contaminada puede ser considerado como peligroso si los componentes de éste se encuentran incluidos en el listado realizado por la Agencia de Protección Medioambiental (EPA). Este listado incluye más de 700 sustancias con características tóxicas, oncogénicas, mutagénicas o teratogénicas en humanos, o bien que provocan impactos adversos sobre el medioambiente. Además de estas consideraciones, se debe tener en cuenta que cualquier material descargado tendrá la consideración de peligroso si éste, o cualquiera de sus componentes, poseen alguna de las siguientes características:

PROPIEDADES INFLAMABLES

- Si es un líquido con punto de ebullición menor de 140°F (60 °C).
- Si es capaz, a temperatura y presión ambiente, de producir ignición a través de fricción, absorción o por cambios químicos espontáneos.
- Si es un gas comprimido inflamable.
- Si es un oxidante.

PROPIEDADES CORROSIVAS

- Si en estado líquido tiene un pH igual o menor de 2, o igual o mayor de 12.5.
- Si es un líquido que corroe el acero.

PROPIEDADES REACTANTES

- Si es normalmente inestable o por cambios provoque detonación.
- Si reacciona violentamente con el aire.
- Si forma mezclas potencialmente explosivas con el aire.
- Si cuando se mezcla con el agua, genera gases tóxicos, vapores, etc.
- Si posee entre sus componentes cianuros o sulfuros.
- Si es capaz de detonar o provocar reacciones explosivas.
- Si es un explosivo.

PROPIEDADES TOXICAS

- Si cualquiera de sus componentes no supera el “Toxicity Characteristic Leaching Procedure (TLCP) test”.

3. RELEVANCIA MEDIOAMBIENTAL DE LOS AMBIENTES DE ESTUARIO

Un **estuario** es un cuerpo de agua parcialmente encerrado que se forma cuando las aguas dulces provenientes de ríos y quebradas fluyen hacia el océano y se mezclan con el agua salada del mar. Los estuarios y las áreas circundantes son áreas de transición de tierra a mar y de agua dulce a salada. Aunque influenciados por las mareas, los estuarios están protegidos de las olas, vientos y tormentas marítimas por los arrecifes, islas que actúan como barreras o franjas de terreno, lodo o arena que definen la frontera del estuario.

Los estuarios se encuentran en todas las formas y tamaños y suelen llamarse; bahías, lagunas, puertos, ensenadas o canales. A este respecto, se debe indicar que no todos los cuerpos de agua con estos nombres son necesariamente estuarios, puesto que la peculiaridad de un estuario es la mezcla de agua dulce con salada y no las nomenclaturas convencionales que, sobre este término, se han venido utilizando tradicionalmente.

El ambiente de estuario figura entre los más productivos en la tierra, creando cada año más materia orgánica que áreas comparables en tamaño (bosques, prados o tierras agrícolas). Dentro y fuera de los estuarios se encuentran una gran variedad de hábitats que incluyen; aguas poco profundas,

pantanos de agua dulce y agua salada, playas arenosas, llanos de arena y lodo, costas rocosas, arrecifes de ostras, bosques de manglares, deltas de ríos, lechos de algas marinas y pantanos boscosos.

La variedad de hábitats estuarinos alberga una abundante y diversa vida silvestre: pájaros costeros y marinos, peces, cangrejos y langostas, mamíferos marinos, almejas y otros crustáceos, gusanos marinos y reptiles son algunos de los animales que viven dentro y alrededor de los estuarios. Los estuarios son lugares donde el río se encuentra con el mar, con ecosistemas muy diferentes unos de otros.

Los estuarios son críticos para la supervivencia de muchas especies. Miles de pájaros, mamíferos, peces y otros tipos de vida silvestre dependen de los hábitats estuarinos para vivir, alimentarse y reproducirse. Los estuarios proveen puntos ideales para que los pájaros migratorios descansen y se reabastezcan durante sus jornadas. Muchas especies de peces y crustáceos dependen de las aguas estuarinas como lugares seguros para reproducirse, de aquí el sobrenombre dado a los estuarios de *cunas marinas*. Cientos de organismos marinos, incluyendo peces de alto valor comercial, dependen de los estuarios para algún punto de su desarrollo.

A parte de servir como hábitats importantes para la vida silvestre, los pantanos que bordean muchos de los estuarios también desempeñan otras funciones de alto valor. El agua drenada de tierra arriba trae sedimentos, nutrientes y otros contaminantes, según el agua fluye a través de ellos, permite que se filtren muchos de los contaminantes y sedimento. Este proceso de filtración crea agua más clara y limpia, lo cual beneficia tanto a las personas como a la vida marina. La vegetación en los humedales también actúa como amortiguadores naturales entre la tierra y el océano absorbiendo las inundaciones y disipando las marejadas. Esto protege los organismos de tierra adentro así como también las propiedades, de tormentas y daños por inundaciones. La vegetación de los estuarios también ayuda a prevenir la erosión y a estabilizar las costas.

Los beneficios económicos de los estuarios deben ser considerados. Las aguas costeras de los estuarios sostienen infraestructuras públicas, que sirven

de puertos y muelles para la transportación y embarques. Se han hecho algunos intentos para medir ciertos aspectos de la actividad económica que depende de los estuarios de América y otras aguas costaneras, y así, los estuarios proveen hábitat para más del 75% de los peces comerciales y el 80-90% de los recursos de pesca recreacional.

En resumen, los estuarios proveen una variedad de recursos, beneficios y servicios. Algunos de ellos se pueden medir en términos económicos, pero otros no. Los estuarios son recursos naturales que no se pueden reponer, y por tanto deben ser manejados cuidadosamente para el beneficio mutuo, de los que los disfrutan y de los que dependen de ellos. La presión que se ejerce sobre ellos, y muy especialmente la contaminación hídrica, está perturbando el balance natural de los ecosistemas estuarinos y amenazando su integridad, ya que el resultado de dicha presión tiene como resultado tanto la existencia de aguas poco potables como la aparición de brotes de algas dañinas, elevada mortandad de peces y vida silvestre, pérdida de hábitats, etc., que crean graves problemas tanto para la salud humana como para los recursos naturales (Environmental Health Center, 1998).

3.1 UTILIZACIÓN DE INVERTEBRADOS ACUÁTICOS EN INVESTIGACIÓN ECOTOXICOLÓGICA

Las ventajas que presentan los invertebrados en la investigación ecotoxicológica están basadas en su utilidad para la búsqueda de eslabones mecanicísticos entre los efectos que aparecen a nivel individual y las consecuencias que acarrearán a los niveles superiores de organización, tales como población y comunidades. Tanto en ensayos de laboratorio como en estudios de campo, el valor real o potencial que aportan los invertebrados es evaluado como alternativa por su capacidad de reemplazar, completar o simplemente prevenir el uso de vertebrados para estas técnicas.

Hoy en día, diferentes especies de organismos invertebrados vienen siendo utilizadas en ensayos de laboratorio para evaluar la toxicidad de agentes químicos. El desarrollo de bioensayos con estos organismos se encuentra estimulado tanto por sus características biológicas como de grado de sensibilidad que presentan frente a ellos. Los aspectos biológicos están principalmente

relacionados con su mantenimiento en laboratorio bajo condiciones controladas, mientras que el grado de sensibilidad hace referencia a las características de especificidad que han demostrado frente a exposiciones con diferentes clases de compuestos químicos.

Asegurar una correcta valoración del riesgo ambiental de estos compuestos conlleva inevitablemente la identificación del riesgo, la valoración del cociente concentración-efecto, la valoración de la exposición y finalmente la caracterización del riesgo (Fan et al., 1995), y es precisamente en estos términos donde los invertebrados han demostrado ser una herramienta fundamental, y por ello han sido utilizados durante décadas, mediante su aplicación en ensayos de toxicidad aguda y crónica, para la identificación del riesgo, aprovechando diferentes características inherentes a ellos.

Desde principios de los años 80, al menos cuatro ensayos han sido propuestos con organismos invertebrados acuáticos obtenidos a partir de huevos criptobióticos o inactivos (cistos), dos de ellos de origen marino y otros dos de agua dulce (Snell and Persoone, 1991). El interés primordial sobre estos ensayos está basado en reducir considerablemente los procesos de crianza y mantenimiento de especies, en la sincronía en cuanto a la obtención de individuos y en la similitud tanto fisiológica como genética de las poblaciones. Todo ello hace que el grado de incertidumbre del ensayo quede minimizado, que los costes se reduzcan drásticamente y que el potencial de regulación y precisión del ensayo quede significativamente reforzado (Persoone and Jansen, 1993).

3.2 Relevancia de la *Artemia franciscana* en los estudios ecotoxicológicos sobre ambientes de agua salada

Las artemias son crustáceos de aguas salinas que toleran un amplio rango de salinidad, pero con un amplio rango que abarca prácticamente desde aguas frescas hasta las saturadas. Son fáciles de criar y también económicas, además comercialmente se puede acceder a sus huevos en cualquier época del año. La *Artemia franciscana* es la más común de las especies y una de las más utilizadas.

Multitud de estudios ecotoxicológicos, acerca de la susceptibilidad de diferentes formas larvarias de crustáceos marinos confirman la idoneidad en su utilización (Barahona et al, 1994; Sánchez-Fortún et al, 1995), y en este sentido,

diferentes variedades del género *Artemia*, han sido utilizadas como elementos biosensores para la determinación del riesgo ecotoxicológico que supone la presencia de contaminantes en el medio acuático. Diferentes estudios sobre crustáceos acuáticos han permitido establecer modelos de estudio del efecto de dichos contaminantes sobre la estructura del ADN lo que sin duda, permite completar la valoración del efecto genotóxico que supone la presencia de contaminantes tóxicos y su repercusión global sobre la cadena trófica.

4. ARTEMIA FRANCISCANA

4.1 INTRODUCCIÓN

Los artrópodos son uno de los grupos animales más amplios y diversos. Incluyen los trilobites, quelicerados, insectos y crustáceos. Presentan un exoesqueleto que se va modificando a través de mudas periódicas para acomodarse al crecimiento. Su cuerpo presenta segmentos con apéndices articulados apareados. Los crustáceos son principalmente artrópodos acuáticos. Su cabeza presenta cinco segmentos fusionados que soportan cinco pares de apéndices, incluyendo dos pares de antenas. La excreción y osmoregulación se realiza a través de la especialización de metanefridios, especie de tubos con células ciliadas que aspiran los residuos. La respiración es branquial. El cerebro se divide en tres y frecuentemente presentan ojos compuestos. La mayoría presentan una reproducción sexual, sexos separados y órganos de reproducción pares con fecundación interna (Green, 1981).

Los anostracos son branquiópodos que no presentan caparazón y en muchas de sus formas se parecen a los primitivos crustáceos. El grupo es reducido e incluye a camarones de aguas salinas, su cuerpo es alargado y existe una pequeña especialización de segmentos y apéndices. El corazón es un tubo dorsal a lo largo del cuerpo. El cuerpo presenta una cavidad, el hemocele. Su aparato reproductor derivado del tubo celómico, presentando sexos separados y órganos sexuales pares. El aparato excretor se localiza en las glándulas coxales derivadas de rudimentos del celoma. El intestino tiene forma de J, muchos se alimentan de comida en suspensión o de desechos del

lecho acuático. Los apéndices son anchos y planos, los filópodos muy parecidos a los de los primitivos crustáceos y en ellos vemos las branquias, las cuales se localizan en los apéndices del tronco (Martin, 1992). El exoesqueleto es fino, flexible y no está calcificado. El sistema nervioso es el típico de los artrópodos y anélidos y no presenta tendencia a la cefalización. El desarrollo incluye un estado de nauplio, metanauplio y postnauplio para alcanzar finalmente el de larva.

Estos crustáceos habitan temporalmente charcas, acequias, reservorios acuáticos producidos por nieve derretida, lagos salinos o alcalinos, y buscan zonas de poca o ninguna depredación.

4.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Animalia

Filo: Artrópoda

Subfilo: Crustácea

Clase: Braquiópoda

Familia: Artemiidae

Género: Artemia

Especie: A. franciscana



Fig. 8 Artemia franciscana adulta

Los braquiópodos anostraca son el mejor ejemplo de la morfología de los crustáceos primitivos, lo que nos permite realizar estudios sobre el papel de los diferentes contaminantes sobre invertebrados acuáticos.

Las artemias son crustáceos de aguas salinas que toleran un amplio rango de salinidad (Fig. 8), pero con un amplio rango que abarca prácticamente desde aguas frescas hasta las saturadas. Son fáciles de criar y también económicas, además comercialmente se puede acceder a sus huevos en cualquier época del año. La *Artemia franciscana* es la más común de las especies y una de las más utilizadas (Persoone y col., 1980).

4.3 ANATOMÍA EXTERNA

El cuerpo de los anostraca se encuentra dividido en cabeza, tórax y abdomen. La cabeza y los apéndices se encuentran especializados como el de los primitivos crustáceos. Los apéndices torácicos son todos semejantes y no se especializan. El abdomen carece de apéndices (Fig. 9)

La cabeza está compuesta por cinco segmentos que no se ven divididos, lleva un par de ojos compuestos y uno simple; en estado de nauplio se observa un ojo medial hacia el final anterior. Los ojos no se consideran parte de los apéndices. La primera antena presenta quimiosensores, siendo éste el apéndice del primer segmento de la cabeza y no presenta articulación. La segunda antena es mayor y presenta dimorfismo sexual, las de los machos son mayores y se modifican hacia una especie de enganche para la hembra durante la copulación, se componen de dos articulaciones. La antena segunda de las hembras es menor y más fina que la primera y se compone de una única articulación. El *labrum* o labio superior es grande medial, forma un pliegue ventral a la pared del cuerpo hasta la base de la segunda antena. No es par y tampoco tiene segmentos. Se extiende posteriormente y cubre la superficie ventral de la cabeza, incluyendo la boca. Dos mandíbulas se abultan en ambas caras de la cabeza y forman el tercer segmento de la cabeza. Las mandíbulas se curvan medialmente y se encuentran la una con la otra en la mitad, y es en su borde ventral donde aparecen los dientes. La boca se localiza en la mitad ventral entre las mandíbulas, siendo necesario mover el *labrum* hacia un lado para ver el final ventral de mandíbulas y boca. La primera y segunda mandíbulas son pequeñas y difíciles de observar. La primera maxila es mayor que la segunda y soporta un abultamiento dirigido anteriormente. La primera maxila se localiza inmediatamente posterior a las mandíbulas sobre la superficie ventral de la cabeza y se usa para transferir comida desde los apéndices torácicos hasta la boca, la segunda maxila es minúscula, casi un vestigio y en ella se ven los nefridióporos. El aparato excretor del adulto está compuesto de dos glándulas maxilares, o glándulas coxales, se localizan en el segmento de la segunda maxila donde forman un acumulo de abultamientos sobre las superficies dorso-laterales. Pueden también verse canales arrollados

sin los abombamientos. Las glándulas maxilares se abren en la segunda mandíbula a través de los nefridioporos (Fig. 10).

El tórax consiste en once segmentos independientes. No presenta caparazón y ninguno de sus segmentos se encuentran fusionados entre si; no existe cefalotórax. Cada segmento torácico lleva un par ventral de toracópodos semejantes en su forma a una hoja, se conocen como filópodos, estos son semejantes a lo largo de los once segmentos y no se observa especialización regional, su única diferencia es la talla. El exoesqueleto de los miembros es fino y flexible, para su rigidez es necesaria la presión de la sangre. Los filópodos son usados para nadar, alimentarse y respirar. Hay semejanzas entre partes de lo filópodos y los ancestrales apéndices birramos, pero la proposición de estas afinidades aún está en discusión. Los apéndices son aparentemente unirramos aunque hay partes que pueden ser consideradas birramas. Cada apéndice es plano y tiene forma de hoja y nos recuerda a los apéndices primitivos birramos de los mixópodos, lo que no existe es la parte cilíndrica. A lo largo del borde dorsal se une un gran protopodio basal, algunas extensiones pequeñas se extienden hasta los bordes lateral y medial del protopodio, los procesos laterales son los éxitos, los mediales los énditos. Cinco o seis enditos se extienden hacia el margen medial del protopodio y son extremadamente pequeños, los proximales y distales al ser un poco mayores pueden verse con facilidad, sobre los enditos, en dirección medial se localizan una serie de setas, y éstas son el mayor filtro del aparato digestivo, las distales, mayores que las anteriores, pueden considerarse como el endopodio de los apéndices birramos ancestrales. Hay tres largos éxitos sobre el margen lateral del protopodio, los proximales y mediales no llevan setas, el medial correspondería a las branquias. El éndito distal puede compararse al exopodio de los apéndices birramos, éste es el único proceso unido por articulación al protopodio y lleva una seta en forma de pluma que es usada para nadar.

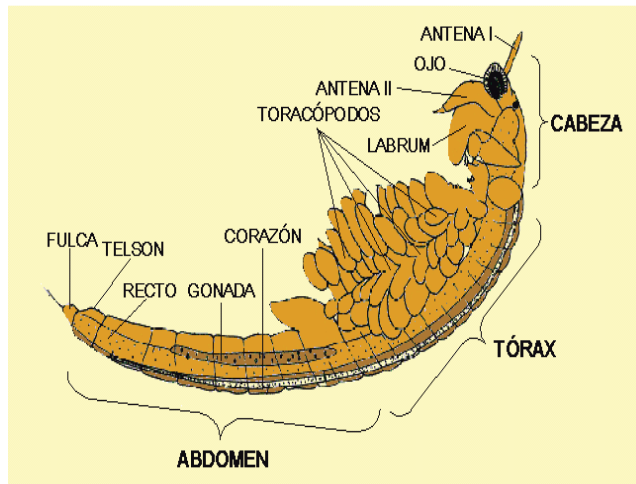


Fig. 9 Esquema de la anatomía de una hembra de *Artemia franciscana*.

La mayoría de los anostracos se alimentan de comida en suspensión, aunque hay unos pocos que son carnívoros. Un surco longitudinal y medioventral se utiliza para la alimentación, aparece entre la gnatobase y los filópodos. La boca se ve en la cara anterior del final del surco. Los movimientos natatorios de los filópodos crean corrientes en el interior del surco, el agua se fuerza lateralmente hacia la pantalla de setas y las partículas de comida son filtradas a partir del agua que permanece en el surco. La comida se mueve hacia la zona anterior gracias a las setas de la gnatobase. En el final anterior se enredan en un moco y desde el *labrum* se transfieren hasta la boca por las setas de la primera maxila.

Los dos segmentos posteriores del tórax corresponden a la zona genital y allí se localizan por tanto los genitales que son externos. Las hembras tienen una bolsa cónica denominada ovisaco que contiene los huevos. Los machos llevan un par de túbulos retráctiles, son los penes y pueden observarse en la parte posterior del último par de filópodos.

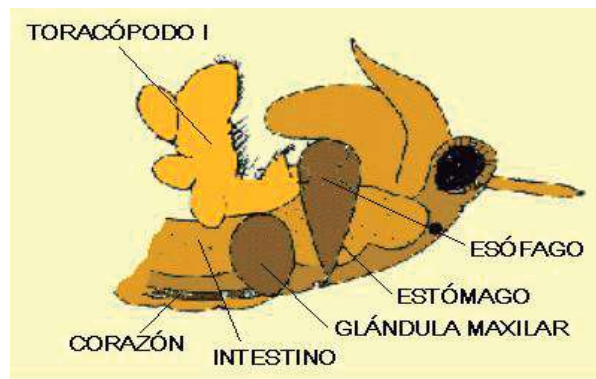


Fig. 10 Cabeza y tórax anterior de *Artemia salina*

El abdomen corresponde a seis segmentos, posteriores al aparato genital, es casi cilíndrico. El final corresponde al *telson* y éste lleva un par de surcas caudales en su fin. Ninguno de los segmentos abdominales lleva apéndices. El ano se localiza sobre el *telson* entre las dos surcas caudales (Fig. 11)



Fig. 11 Tórax posterior y abdomen de una hembra de *Artemia salina*

4.4 ANATOMÍA INTERNA

4.4.1 Sistema digestivo

El intestino es un tubo que se extiende a lo largo del animal. La boca se localiza en la parte ventral, hacia la mitad de la cabeza, entre las superficies opuestas de las mandíbulas. El esófago en posición vertical se extiende dorsalmente desde la boca hasta el estómago donde se abre, lo que ocurre por encima de la posición de la boca. El estómago es una expansión del intestino en mitad de la cabeza. Dos grandes ampollas cecales se localizan anterolaterales a la pared del estómago. El intestino es un tubo largo que va desde el estómago a través del tórax y parte del abdomen. El intestino medio es el lugar de secreción de enzimas y donde se produce la digestión y absorción; lo circunda el hemocele, bañado en sangre y muchos de los materiales atraviesan su fina pared. Al intestino se une un corto recto, localizado en el cuarto segmento del abdomen, es el responsable de la formación de bolitas fecales y se abre al exterior a través del ano el cual se encuentra entre las furcas caudales y está provisto de un esfínter.

4.4.2 Sistema vascular

El corazón tubular se encuentra dorsal al intestino, se rodea por la cavidad pericardial que no se trata de un espacio celómico. En su pared lateral se abren un par de ostiolos, que son pares a lo largo de los segmentos del tronco y sólo en la parte posterior, al final del corazón aparece uno único. Anteriormente se abre en el hemocele cuyo espacio se extiende por los tejidos del animal, el corazón no presenta claros movimientos peristálticos pero sí se observa una contracción simultánea en todo él. Se pueden observar corpúsculos en el flujo de sangre, tienden a moverse posteriormente en el seno pericardial, cuando se cierra vemos como pasan a través de los ostiolos de la pared del corazón y se dirigen anteriormente una vez dentro del lumen del corazón. Se mueven en oleadas acompañando a las contracciones del corazón. La sangre algunas veces contiene hemoglobina disuelta en el plasma, aunque esta presenta poco oxígeno disuelto, lo que suele ser suficiente para ver una pigmentación rosada.

4.4.3 Sistema respiratorio

El intercambio de gas se realiza por permeabilidad en los éxitos mediales donde se localizan las branquias, por tanto en los apéndices del tórax.

4.4.4 Sistema osmorregulador y Excreción

Existen un par de glándulas maxilares en el segmento de la segunda maxila; éstas se les relacionan como un órgano excretor, pero su papel es ante todo osmorregulador y tienen poco que ver con la excreción de desechos. El nitrógeno se elimina a través de la superficie branquial. Cada glándula maxilar se encierra en un saco, derivado del espacio celómico, desde el cual un conducto excretor largo se dirige hasta el nefridioporo localizado en la pequeña maxila. El conducto envuelve a su alrededor el final del saco. La glándula se rodea del hemocèle y se baña con la sangre. El epitelio de este fondo de saco se equipa con porositos que lo que hacen es ultrafiltrar la sangre en el interior del *lumen* de este fondo de saco; este ultrafiltrado se va modificando según baja por el conducto hacia el exterior. La *Artemia* es un eficiente osmorregulador y soporta importantes rangos de salinidad

4.4.5 Sistema reproductivo

Las gónadas son dos pares de tubos localizados dorso-lateralmente en la parte posterior del tórax y anterior del abdomen. Durante el apareamiento el macho se aproxima a la cara dorsal de la hembra y se cuelga de ella con su larga segunda antena; el macho gira su cuerpo alrededor de la hembra, inserta los penes en el ovisaco y deposita el esperma. Ambos permanecen acoplados durante algunas horas en las cuales la copulación puede ocurrir en sólo unos minutos. Los huevos fecundados permanecen en el ovisaco donde se recubren de una especie de cáscara. Son dos los tipos de huevos que se producen, uno presenta una fina cáscara y eclosiona en el interior del ovisaco, el otro presenta una cáscara más dura y puede ser viable durante varios años fuera del agua, es cuando toma contacto con aguas salinas cuando eclosiona. Ambos, al eclosionar, originan una larva denominada nauplio (Browne, 1993).

4.5 COMPORTAMIENTO DE LA ARTEMIA

Las artemias adultas nadan constantemente usando los filópodos de los apéndices torácicos. El agua en forma de ondas atraviesa la serie de filópodos y las partículas de comida pasan al surco alimenticio, y se crea un efectivo con el movimiento de natación de las setas. Por tanto, la locomoción y la natación son simultáneas. La Artemia también se alimenta escarbando en algas de superficies duras. Los anostracos pueden originar rápidos movimientos por la flexibilidad de su abdomen a lo que ayuda la seta plumosa con función natatoria.

Las artemias presentan tres ojos, es muy sensitiva a la luz y da muy variadas respuestas a ella. En general da una respuesta fototáctica positiva a bajas intensidades de luz y negativa a las altas y medias, aunque las respuestas varían, quizá dependiendo de las condiciones fisiológicas del animal como peso, edad o temperatura. Muchos anostracos poseen lo que se denomina “reacción dorsal a la luz” en respuesta a los rayos solares mantienen su superficie dorsal en alto, unos pocos como la Artemia nadan hacia atrás, pero otros crustáceos salinos se posicionan con su cara ventral en alto por que la luz natural les viene de arriba, aunque se ha visto que en condiciones laborales donde la luz procede de otros puntos esta posición cambia (Pardi & Papi, 1961).

4.6 CICLO VITAL

Los lagos salados y estanques de las salinas, con poblaciones de artemias, se encuentran distribuidos por todo el mundo. En ciertos momentos del año, grandes cantidades de minúsculas partículas marrones (de 200 a 300 micras de diámetro) aparecen flotando en la superficie de los lagos y son arrojadas sobre las orillas por acción de las olas y el viento. Este polvo aparentemente inerte está formado por quistes secos inactivos en estado de criptobiosis (durmientes) manteniéndose así tanto tiempo mientras permanezcan secos.

Una vez puestos en agua de mar, los quistes bicóncavos se hidratan tomando forma esférica y el embrión recobra su metabolismo reversible

interrumpido. Tras unas 24 horas, la membrana externa de los quistes se rompe y aparece el embrión rodeado de la membrana de eclosión. Durante las siguientes horas, el embrión abandona completamente la cáscara vacía, la cual permanece todavía unido dentro de la membrana de eclosión se completa el desarrollo del nauplio, sus apéndices comienzan a moverse y en un breve periodo de tiempo la membrana de eclosión se rasga emergiendo el nauplio que nada libremente.

Se pueden considerar los siguientes estadios: Un periodo de nauplio (L1), periodo de metanauplio con cuatro estadios (L2, L3, L4, L5), periodo de postmetanauplio con 7 estadios (L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12) y un periodo postlarval con los 5 últimos estadios (L13, L14, L15, L16, L17). La *Artemia* requiere alrededor de 14 mudas para alcanzar su tamaño final, y su madurez sexual la adquiere alrededor de la duodécima muda, en las artemias las larvas eclosionan con unos pocos segmentos y gradualmente los aumentan hasta llegar a un número de 19 con las sucesivas mudas (Fig. 12). Es el teloblasto el que añade nuevos brotes de segmentos en las mudas hasta alcanzar el número correspondiente. Los brotes de los miembros aparecerán después sobre estos segmentos pero pasadas muchas mudas. La *Artemia* adulta al final contabilizará con 19 segmentos en su tronco (Anderson, 1967).

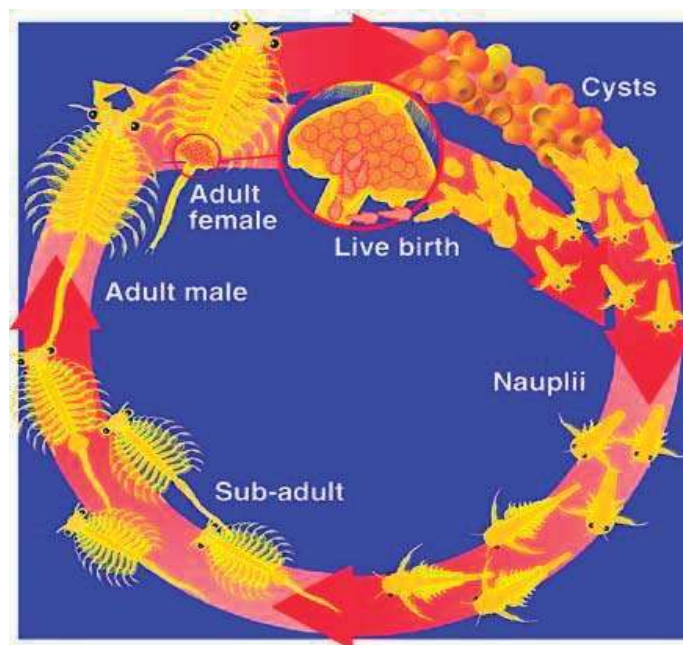


Fig. 12 Ciclo vital de la *Artemia* - quistes, nauplio, secundario-adulto, adulto, vida.

II. OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE PARTIDA

El desarrollo de la presente tesis está basado en la hipótesis inicial de riesgo medio ambiental, provocado por la posible presencia de determinados contaminantes que puedan estar presentes en los efluentes provenientes de la instalación, puesta en marcha y mantenimiento de plantas desaladoras de agua marina para su utilización tanto agrícola e industrial, como para el consumo humano. Estos contaminantes pueden llegar a provocar severos daños a la fauna acuática presente en dichos ecosistemas, por lo que resultaría fundamental mantener un protocolo de control para evitar la aparición de daños sobre estos organismos. En muchas ocasiones, el efecto toxicológico se traduce en la aparición de un fenómeno de letalidad. Por ello, se propone el estudio de letalidad como método de detección rápida y temprana, seleccionando a larvas de *Artemia* como modelo biosensor por su utilización generalizada para determinación de toxicidad en ambientes de agua salada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Valorar el efecto citotóxico provocado por los principios activos, seleccionados, sobre distintos estadios larvarios de *Artemia franciscana*, mediante la técnica descrita por Persoone y col. (1989) y modificada por Sánchez-Fortún y col. (1995). Este primer objetivo resulta fundamental para la obtención de las correspondientes concentraciones eficaces medias.

2. Determinar qué estadio larvario de *Artemia franciscana* resultaría idóneo para desarrollar el modelo de evaluación de daño masivo.

3. Evaluar el posible daño sobre larvas de *Artemia franciscana*, provocado por contaminantes seleccionados por su frecuencia de aparición en vertidos sobre ambientes acuáticos de estuario, derivado del proceso de mantenimiento de plantas desaladoras, determinando la dosis letal 50 y estudiando el efecto subletal a nivel fototáctico.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. COMPUESTOS QUÍMICOS EMPLEADOS

Los compuestos químicos seleccionados para el estudio lo fueron en función de su capacidad para el empleo como antifúngicos, alguicidas y antiprotozoarios, problemas usuales que se presentan concomitantes a otros como son la formación de espumas, corrosión, etc. en las plantas desaladoras.

1.1 VERDE DE MALAQUITA: Trifenilmetano (4-[4-trimetilaminofenilo]-fenilometilo]-N,N-dimetilo-anilina)

Colorante activo frente a una gran variedad de parásitos y agentes patógenos como hongos y bacterias, su principal aplicación es para el tratamiento contra parásitos protozoos de agua. Se cree que el verde de malaquita y su metabolito, el verde leucomalaquita, podrían generar daños genéticos y cáncer.

1.2 SULFATO DE COBRE: Cu_2SO_4

Está aprobado por la Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) y por la Fundación Nacional de Ciencias (NSF, por sus siglas en inglés). También está aprobado en Canadá. Las aplicaciones como pesticida controlan algas y plantas dañinas en sistemas acuáticos municipales, agrícolas, privados y de cultivo, y también las raíces en las tuberías de desechos domésticos. Asimismo, controla caracoles (causantes de la dermatitis esquistosomática) y renacuajos (dañinos para la producción de arroz). Es un funguicida valioso y en la actualidad, las pinturas a base de cobre son el producto anti-incrustantes más utilizado.

AGUA MARINA SINTÉTICA

La preparación de agua marina se practicó a partir de sal marina obtenida de Sera (Sera Meersalz, Sera, Germany), especialmente preparada mediante suplementación de calcio y oligoelementos para un mejor cultivo de

algas e invertebrados de agua salada. Este preparado se presenta libre de nitratos, fosfatos y salicatos, y lleva adicionados quelatos especiales que contribuyen a la detoxicación de metales pesados como el cobre.

Para la preparación de agua marina reconstituida, se disolvió dicha sal marina en agua destilada hasta alcanzar una concentración del 35 %. El agua marina así reconstituida era posteriormente aireada y removida mediante bomba sumergible durante 24 horas, para conseguir las condiciones apropiadas de oxígeno y dióxido de carbono.

2. OBTENCIÓN DE *ARTEMIA FRANCISCANA*

La obtención de larvas de *Artemia franciscana* se practicó a partir de huevos desecados obtenidos de Argent (Argent Chemical Laboratories, Washington, USA) y utilizando la línea *ARGENTEMIA Grade II Silver Label*, línea procedente del *North Arm Great Salt Lake* (USA). La técnica aplicada está basada en la metodología propuesta por Persoone y col. (1989), si bien con la aplicación de diferentes modificaciones planteadas con posterioridad a la metodología original (Barahona y col., 1994; Sánchez-Fortún y col., 1995)

Los huevos desecados son hidratados en placas de Petri mediante inmersión en agua destilada a una temperatura de 4°C manteniéndolos así durante un periodo de 12 horas en ambiente de oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, aquellos huevos que flotaban eran desechados, y el resto eran transferidos a una probeta de decantación que contenía agua marina reconstituida a 25°C, y a la que se aplicaba una fuente de luz de aproximadamente 60W. Ha dicho medio, conteniendo los huevos hidratados, se le mantenía con burbujeo continuo, con el fin de facilitar su eclosión.

Bajo estas condiciones, al cabo de 16-18 horas comenzaba la eclosión de los quistes, y transcurridas 20 horas desde que los quistes eran incubados en el medio salino reconstituido se obtenía una amplia población de nauplios libres. Los nauplios eran mantenidos hasta que alcanzaban las 24 horas de vida, los cuales eran utilizados para la realización de pruebas de toxicidad con

larvas de esta edad. Una parte de los nauplios obtenidos, eran reservados en la probeta de decantación hasta alcanzar las 48 y 72 horas de vida; bajo las mismas condiciones, y con ellas se practicaban los correspondientes ensayos de toxicidad a dichas edades (Fig. 13).

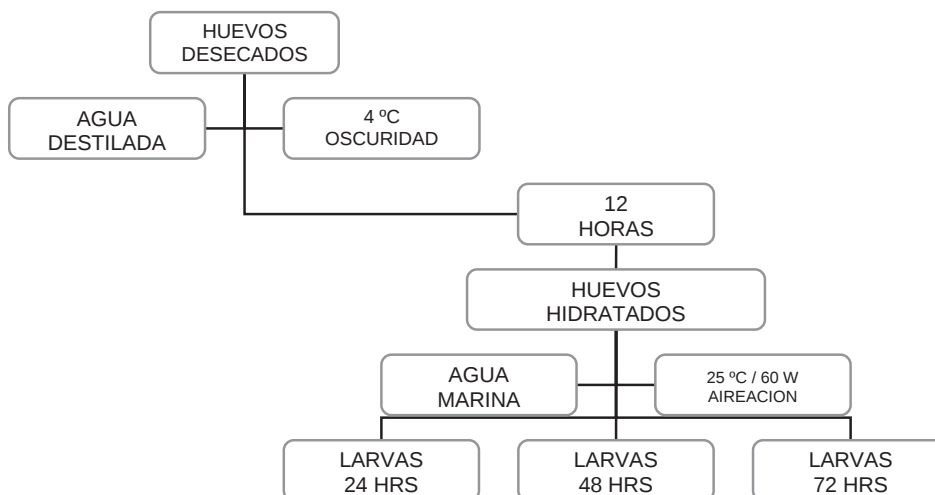


Fig. 13 Esquema de la obtención de larvas de *Artemia* a partir de huevos deshidratados.

3. ESTUDIOS DE TOXICIDAD AGUDA: LETALIDAD

3.1 Distribución de larvas de *Artemia*

Las larvas de *Artemia* obtenidas, según los tres estadíos de desarrollo larvario estudiados (24, 48 y 72 horas de vida), fueron distribuidas en un conjunto de 10 individuos por cada uno de los 6 pocillos existentes en cada una de las placas multipocillo utilizadas.

Para ello, un conjunto de larvas procedentes del total de larvas obtenidas eran separadas del resto y se transferían a una nueva placa de Petri, teniendo cuidado de traspasar el menor volumen de medio salino posible. Seguidamente, y por medio de una pipeta Pasteur, un conjunto de 10 larvas se introducía en cada uno de los pocillos, realizando una confirmación posterior de

su traslado, bajo lupa binocular, para asegurarnos de que cada pocillo poseía el número exacto de larvas.

3.2 Exposición de larvas a los compuestos químicos

3.2.1 Exposiciones previas

En cada uno de los biocidas ensayados se realizaron ensayos de toxicidad previos, con el fin de determinar los valores de concentración letal mínima (CL_{MIN}) y concentración letal máxima (CL_{MAX}).

Para su obtención, se realizaron ensayos sobre placas multipocillo, a concentraciones decrecientes de cada uno de los compuestos químicos ensayados a temperatura ambiente y durante un periodo de 24 horas. Pasado este tiempo, se realizaba la lectura de la placa bajo lupa binocular, contabilizando el número de larvas vivas y muertas en cada uno de los pocillos. En este sentido, y con el fin de establecer parámetros similares para todos los estudios, se consideraba que una larva estaba muerta cuando no exhibía ningún tipo de movimiento, ni interno ni externo, durante un periodo de observación de 10 segundos.

De esta forma, se obtuvieron las correspondientes CL_{MIN} y CL_{MAX} correspondientes a cada uno de los tres estadios larvarios (24, 48 y 72 horas de vida) y con las dos sustancias ensayadas, siendo la primera la máxima concentración ensayada capaz de no provocar efecto letal a ningún individuo expuesto en los dos pocillos correspondientes a la columna empleada para dicha concentración, y la segunda la menor concentración ensayada capaz de provocar efecto letal a todos los individuos expuestos en los dos pocillos correspondientes a la columna empleada para esa concentración. De esta forma, quedaban establecidos los rangos de concentración que posteriormente serían aplicados para los diferentes ensayos de toxicidad aguda (Fig. 14).



Fig. 14 Esquema de la realización de los ensayos de letalidad con larvas de *Artemia* de 24, 48 y 72 horas de vida.

3.2.2 Exposiciones finales

Una vez establecidas las correspondientes CL_{MIN} y CL_{MAX} , se practicaron las correspondientes exposiciones de las dos sustancias empleadas en los tres estadios larvarios, aplicando un total de 7 concentraciones dentro del rango establecido.

Las condiciones de ensayo se practicaron de igual modo que como fueron realizadas para los ensayos preliminares, realizando un total de 4 réplicas por cada uno de los ensayos.

4. ESTUDIOS DE TOXICIDAD SUBAGUDA: INHIBICIÓN DEL FOTOTACTISMO

4.1 Distribución de larvas de *Artemia*

Para la realización de los estudios de inhibición del fototactismo, se utilizaron únicamente larvas de *Artemia* de 24 horas de edad, las cuales eran expuestas a concentraciones subletales de los diferentes biocidas ensayados, correspondientes a 1/10, 1/25, 1/50 y 1/100 de la CL_{50} obtenida en los anteriores ensayos de letalidad.

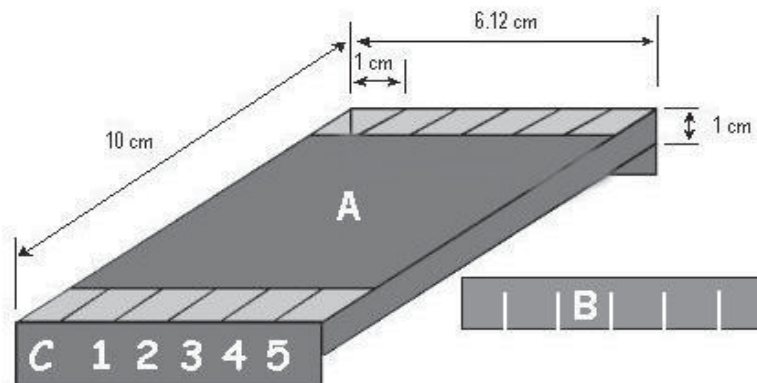
Para ello, se utilizaron placas de 6 pocillos, con una capacidad de 5ml por cada pocillo, donde se incluían un total de 20 larvas de *Artemia*, obtenidas y trasladadas de igual forma a como queda descrito anteriormente. Al igual que ocurría en los ensayos de letalidad, un pocillo era reservado como control. Una vez transcurridas 24 horas de exposición, las larvas eran recolectadas para su inclusión en la cámara oscura, y allí realizar el consiguiente ensayo para la determinación de la capacidad fototáctica de los individuos.

4.2 Ensayos para determinación de la capacidad fototáctica

Los ensayos para valorar la capacidad fototáctica que poseían las larvas de *Artemia* previamente expuestas a los diferentes biocidas, se desarrolló en cámaras oscuras de diseño propio.

Esta cámara oscura la constituían unos receptáculos, contruidos con material plástico duro e inerte, que fueron pintados exteriormente con pintura plástica de color negro, de tal forma que asegurara una completa oscuridad en su interior. Fueron contruidas con unas dimensiones internas de 10cm de longitud, 6.12cm de anchura y 6cm de altura. El interior de la cámara estaba compartimentado en 6 receptáculos estancos de 10cm de longitud, 1cm de anchura y 1cm de altura. Tanto en el extremo proximal como en el terminal poseían 6 ventanas superiores, una en cada extremo por cada receptáculo (Fig. 15).

Fig. 15 Esquema del diseño de la cámara oscura (A) y el elemento de cierre (B) aplicado una vez finalizado el experimento, empleados para la realización de los ensayos de inhibición del fototactismo en larvas de *Artemia* expuestas previamente a los distintos biocidas.



La hipótesis de trabajo estaba basada en la suposición de que, si la exposición subletal al biocida no llegaba a afectar a la capacidad fototáctica de las larvas, éstas serían capaces de practicar todo el recorrido de la cámara, desde la ventana proximal hasta la terminal, cuando una fuente de luz fuera proyectada hasta la ventana terminal, apareciendo en su conjunto en la zona correspondiente a dicha ventana. Por el contrario, si la exposición subletal a un determinado biocida provocara una alteración con respecto a su capacidad fototáctica, el número de individuos capaces de aproximarse a la fuente de luz disminuiría en una relación concentración-dependiente.

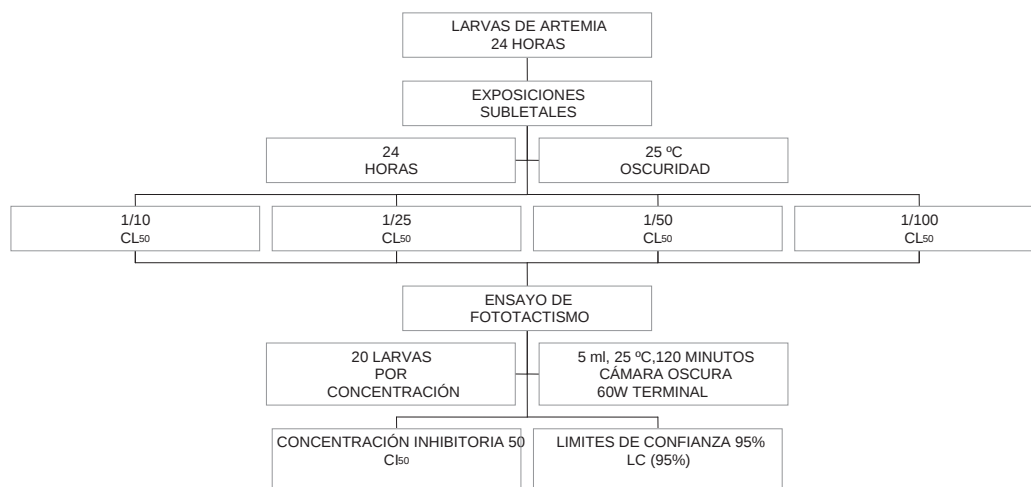
Para corroborar la hipótesis de trabajo, se realizaron experiencias previas con larvas de *Artemia* de 24 horas de edad que no habían sido expuestas a ninguno de los biocidas. Así, se incluyeron en cada uno de los receptáculos, a los cuales se había añadido un volumen de 5ml de agua marina reconstituida convenientemente aireada, un total de 20 larvas por receptáculo. Seguidamente, las ventanas proximales eran tapadas con cinta aislante de color negro, con el fin de completar el ambiente de oscuridad en aquella parte de la cámara. Inmediatamente se aplicaba sobre las ventanas terminales una fuente de aproximadamente 60W, en un ambiente de 25°C, y se practicaron observaciones periódicas con el fin de determinar el tiempo que tardaban las larvas en recorrer la longitud de 10cm que componía cada uno de los receptáculos de la cámara oscura.

Una vez comprobada la capacidad de las larvas de *Artemia* de practicar este recorrido en busca de la fuente de luz, y de quedar establecido el tiempo necesario por las larvas para realizar ese recorrido de 10cm, que quedó establecido en 120 minutos, se realizaron los ensayos con cada uno de los biocidas empleados en este estudio.

Para ello, las larvas de *Artemia* previamente tratadas a concentraciones de 1/10, 1/25, 1/50 y 1/100 de la CL₅₀, tal y como ha quedado explicado anteriormente, fueron introducidas en cada uno de los receptáculos, reservando el receptáculo 1 para los ensayos control y, en su caso, el receptáculo 2 para control de solvente. Siguiendo la metodología anteriormente

citada, la fuente de luz se mantuvo durante un tiempo de 120 minutos, transcurridos los cuales la fracción de receptáculo correspondiente a la ventana terminal era aislada del resto de dicho receptáculo mediante un sistema de esclusa de diseño propio. De esta forma, la cámara era trasladada hasta una lupa binocular, donde el número de larvas que había conseguido llegar hasta la ventana terminal eran contabilizadas. Al igual que ocurría en los ensayos de letalidad, quedaban invalidados todos aquellos ensayos en los que los individuos incluidos en los receptáculos control no hubieran conseguido alcanzar la ventana terminal en un porcentaje igual o superior al 90 %. En total se practicaron 5 réplicas para cada uno de los ensayos correspondientes a cada uno de los biocidas (Fig.16)

Fig. 16 Esquema de realización de los ensayos de fototactismo con larvas de *Artemia* de 24 horas de vida.



5. Tratamiento estadístico de los resultados.

Los resultados obtenidos serán sometidos a tratamiento estadístico. Así, los ensayos de toxicidad aguda, tanto para larvas de *Artemia* de 24, 48 y 72 horas de vida, serán tratados mediante análisis de regresión con el fin de obtener las correspondientes concentraciones letales medias (CL₅₀). Para el análisis comparativo entre estadios larvarios se aplicará T-student, ANOVA seguido de un Test de Bonferroni para una comparación en la que se incluyan todas las variables de estadios larvarios.

IV. RESULTADOS

1. Ensayos de Toxicidad Aguda

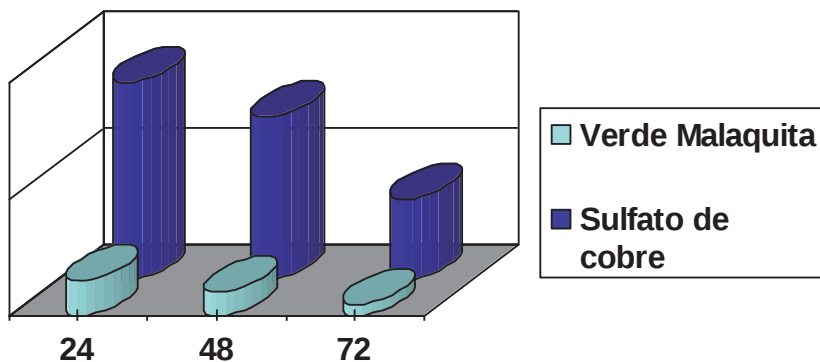
Los resultados obtenidos tras la exposición de larvas de *Artemia*, a los tiempos de desarrollo larvario correspondientes a 24-, 48- y 72 horas de vida, se presentan sumariados en la Tabla 2.

Tabla 2 Valores de Concentración Letal 50 (CL₅₀), con sus correspondientes Límites de Confianza al 95 % (LC 95 %), obtenidos para cada uno de los compuestos biocidas ensayados, sobre larvas de *Artemia* de 24-, 48- y 72 horas de vida.

COMPUESTO	n	CL ₅₀ (LC 95 %)		
		24 h	48 h	72 h
Sulfato de cobre	10	17.12 mg/l (17.07-17.06)	14.23 mg/l (12.23-16.09)	7 mg/l (5.02-9.36)
Verde Malaquita	10	3.67 mg/l (3.19-3.93)	1.67mg/l (1.59-1.75)	0.11mg/l (0.09-0.13)

Diferencias significativas ($P<0.05$) respecto a *Artemia* de 24 y 48 horas de edad, respectivamente (Test de Newman-Keuls).

TOXICIDAD AGUDA



2. Ensayos de Inhibición del Fototactismo

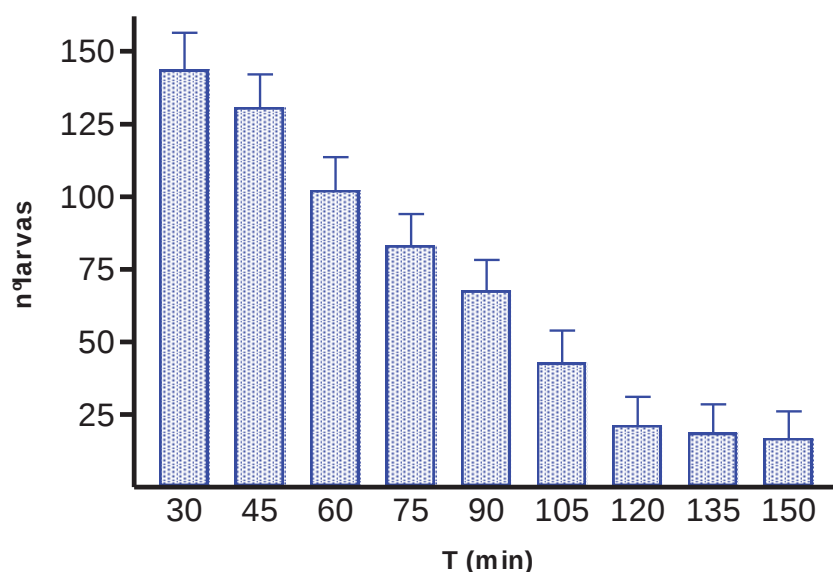
2.1 Determinación del número de larvas de *Artemia* para los ensayos

El establecimiento del mínimo número de larvas de *Artemia* que son necesarias para la realización de los ensayos para determinar el efecto inhibitor sobre el fototactismo de estos organismos, y su relación con el tiempo necesario para conseguir la total migración horizontal de larvas no tratadas, son presentados en la Tabla 3

Tabla 3 Relación entre el número de larvas de *Artemia* no tratadas y el tiempo (T), expresado en minutos, que han necesitado para practicar la migración total por el interior de la cámara oscura (10cm. longitud). Los resultados son expresados como la media ($\pm$ s.e.m.) de seis experiencias (n=6).

T (min)	Nº larvas	n
30.0	143.68 $\pm$ 12.75	6
45.0	130.69 $\pm$ 11.36	6
60.0	102.22 $\pm$ 11.44	6
75.0	83.21 $\pm$ 10.78	6
90.0	67.66 $\pm$ 10.58	6
105.0	42.89 $\pm$ 10.99	6
120.0	21.43 $\pm$ 9.67	6
135.0	18.75 $\pm$ 9.85	6
150.0	16.89 $\pm$ 9.30	6

Fig. 17 Relación entre el número de larvas de *Artemia* y el tiempo necesario para que éstas consigan la migración total en la cámara oscura. Las barras del gráfico establecen la media de 6 ensayos (n=6), cada una con su correspondiente error estándar de la media (s.e.m.).



Los resultados obtenidos revelan una dependencia en cuanto al número de organismos empleados y el fenómeno fototáctico, de tal forma que cuanto mayor sea el número de individuos empleados, menor es el tiempo de progresión en la cámara oscura. De esta forma, y bajo un criterio de utilización del menor número de individuos por ensayo, los resultados obtenidos con larvas de *Artemia* de 24 horas de vida, sin previa exposición a ningún contaminante, son indicativos como parámetros idóneos de estudio en la cámara oscura diseñada un número de 20 larvas por ensayo y un tiempo de ensayo de 120 minutos, ya que no existen variaciones estadísticamente significativas en cuanto al tiempo de ensayo cuando se aplicaba un número de larvas inferior al propuesto.

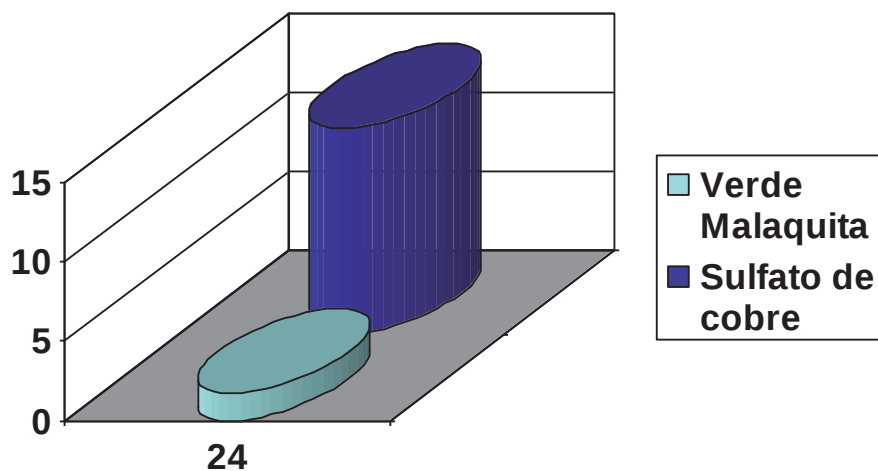
2.2 Exposiciones a los diferentes biocidas ensayados

Los resultados obtenidos tras la exposición de larvas de *Artemia*, a tiempo de desarrollo larvario correspondiente a 24 horas de vida, se presentan resumizados en la Tabla 4.

Tabla 4 Valores de Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}), con sus correspondientes Límites de Confianza al 95 % (LC 95 %), obtenidos para cada uno de los compuestos biocidas ensayados, sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de vida.

COMPUESTO	n	CI_{50} (LC 95 %)
Sulfato de cobre	12	13 mg/l (17-0.38)
Verde Malaquita	12	1.79 mg/l (2.4-1.49)

FOTOTACTISMO



V. DISCUSIÓN

1. Toxicidad Aguda

Uno de los mayores inconvenientes a la hora de practicar los tratamientos con biocidas, anticorrosivos, antincrustantes, y otros productos es su impacto ecológico potencial cuando estos compuestos son vertidos al medio

acuático. En muchos de ellos, el efecto agudo sobre distintas especies acuáticas puede ser el resultado de descargas al medio de altas concentraciones. Entre los diferentes problemas que plantea la aplicación o vertido de dichos productos al medio acuático es el riesgo que supone estas descargas sobre organismos *no diana*, el cual debe ser especialmente considerado.

Según la clasificación de toxicidad aguda propuesta por la Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) y la Environmental Protection Agency (EPA), para la determinación del riesgo medioambiental de los distintos contaminantes, se incluyen en la Clase I todos aquellos compuestos que presentan una CL_{50} inferior a 1 mg/l, Clase II cuando la CL_{50} obtenida se encuadra entre 1 y 10 mg/l, y Clase III cuando el valor de este parámetro se incluyen en el rango entre 10 y 100 mg/l.

Atendiendo a esta clasificación, los resultados de toxicidad aguda obtenidos para larvas de *Artemia* con los biocidas estudiados establecen la existencia de variaciones de sensibilidad entre los tres estadios larvarios estudiados. Así, las larvas de *Artemia* de 72 horas de edad han resultado ser las más sensibles a la exposición de los productos ensayados, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre éstas y las larvas de 24 y 48 horas de edad.

Es bien conocido como los distintos estadios de *Artemia* son sensibles a distintos contaminantes (Sleet and Brendel, 1985), y aunque el estadio larvario correspondiente a las 72 horas de vida parece ser en general el más sensible (Barahona et al., 1994; Sánchez-Fortún et al., 1995), en algunas experiencias para el estudio de toxicidad aguda con estos organismos se ha podido observar como el máximo de sensibilidad correspondía al estadio larvario de 48 horas de edad. Es precisamente en este punto cuando el ciclo vital de los nauplios se encuentra en los estadios larvarios I y II, exhibiendo una gran sensibilidad a la presencia de contaminantes en el medio (Lewis, 1995). En el presente estudio ha quedado demostrado como la fase larvaria de 72 horas se presenta como la idónea para los estudios de toxicidad.

Con todo ello, los resultados indican que, el verde de malaquita puede ser clasificado como de Clase II en los estadios larvarios de 24 y 48 horas estudiados, al igual que el sulfato de cobre en el estadio larvario de 72 horas. Los ensayos de toxicidad con verde de malaquita aportan la evidencia de un efecto letal frente a larvas de *Artemia* de 72 horas de edad encuadrado en la clase I, siendo de clase III para el sulfato de cobre en los estadios larvarios correspondientes a 24 y 48 horas.

Existen suficientes datos en la literatura como para afirmar que la sensibilidad a los distintos contaminantes puede variar dependiendo tanto de las especies como de los distintos estadios de desarrollo (Beattie and Pascoe, 1978; Green et al., 1986; Shazili and Pascoe, 1986; Williams et al., 1986; McCahon and Pascoe, 1988). Los estudios de toxicidad normalizados son usualmente realizados con organismos neonatos o juveniles, sobre los que se reconoce una mayor sensibilidad, asegurando así la obtención de resultados que establezcan niveles de seguridad frente a exposiciones. Por ejemplo, los estudios en peces están basados en general, que las fases tempranas de vida son más sensibles que las fases adultas, aunque en algunos casos la fase de huevo pueda ser más resistente (McKim, 1977; Kevan and Dixon, 1996), y de esta forma ha podido ser demostrado como las pruebas en estos estadios tempranos podrían predecir los efectos en el ciclo vital completo en un rango de factor 2 (McKim, 1985). Así, la relación entre las distintas categorías químicas y los peces quedaría establecido como formas larvarias > formas juveniles > formas adultas (Hutchinson et al., 1998).

Resultados similares han sido obtenidos con invertebrados (Hutchinson et al., 1998), y así, estudios con *Daphnia magna* (Kusk, 1996) demostraron una mayor sensibilidad al primicarb en las formas tempranas que en organismos de 1 semana de edad, y similares resultados fueron obtenidos en los estudios realizados por Stuijzand et al. (2000), mediante la exposición de diazinon frente a diferentes fases larvarias de *Hydropsyche angustipennis* y *Chironomus riparius*, y en ambos casos los primeros estadios eran más sensibles que los últimos en dos órdenes de magnitud.

La mayor o menor sensibilidad de las larvas de *Artemia* frente a los compuestos ensayados, encuadrándola dentro de la categoría de biosensor, varía dependiendo de la especie con la que se compare.

El colorante verde malaquita es usado globalmente como un antifúngico y antiparasitario en crustáceos y peces de importancia en acuicultura. Se le ha empleado para el control del protozoo *Ichthyophthirius multifiliis* (Ichthyoptariasis) y del monogeneo *Dactylogyrus vastator* (Schimmel SC, 1981). Su uso no está permitido en los Estados Unidos, la Unión Europea y en algunos países del sudeste Asiático como Tailandia, debido a que se considera que tiene un rol altamente tóxico sobre las enzimas respiratorias. En adición, es esencial tener periodos largos de carencia después de la aplicación del verde de malaquita debido a los residuos persistentes en los alimentos de origen acuático. También el verde de malaquita es empleado en salud, en la industria de alimentos y textil; así como para el control de helmintiasis en peces y otros organismos acuáticos. Se le ha reportado que causa variación de los parámetros hematológicos, carcinogénesis, mutagénesis, fracturas cromosómicas, teratogenicidad y toxicidad respiratoria.

En el caso del verde de malaquita, y practicando estudios comparativos, los resultados obtenidos determinan que los valores de este colorante para la CL_{50} (96h) = 2.97 mg/L, en *Daphnia magna*, produjeron altos efectos en términos de CL_{50} en relación a las concentraciones requeridas para su uso en acuicultura (J. Iannacone, L. Alvaríño, 2007).

Para el caso del verde de malaquita, el valor de CL_{50} de 96 h en *D. magna* es más tóxico que la CL_{50} de 10 mg/L, del protozoo parásito apicomplexa *Perkinsus marinus* (Levine, 1978) de la ostra *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), y del monogeneo *D. vastator* en *Cyprinus Carpio* (Molnar, 1995). Sin embargo, recomendaciones de su uso como antiséptico en peces, lo recomiendan en baños de 0.10 a 0.15 mg/L de verde de malaquita, por lo que bajo estas condiciones no se estaría produciendo ningún riesgo para el ambiente. También, se han observado en peces para el verde de malaquita

valores de toxicidad que fluctúan entre 0.066 a 1 mg/L, siendo *Clarias macrocephalus* la especie más sensible (Günther, 1864), y *Heteropneustes fossilis* la menos sensible entre cinco especies de peces (Bloch, 1794). El verde de malaquita a 6 mg/L no produjo ningún efecto significativo sobre la bacteria *Vibrio fischeri* (Beijerinck, 1889). El uso del verde malaquita no está permitido en varios países del mundo, debido a que se considera que tiene un efecto altamente tóxico, y debido a los residuos persistentes en el ambiente acuático al emplearse en terapias de inmersión. Por ende, Schmahl, *et al.* (1992) recomiendan que para reducir el riesgo de las terapias de inmersión con verde de malaquita en peces ornamentales como *Paracheirodon axelrodi* (Schultz, 1956), la medicación debe ser a través de la alimentación.

Dentro de las consideraciones del agua para el consumo humano, el cobre está clasificado dentro de la Lista de Parámetros Químicos, junto a otras sustancias de reconocida toxicidad, en la Guía de Calidad del Agua Potable (1993).

Son las pinturas anti-incrustantes, a base de cobre las más usadas en desaladoras y otras actividades de acuicultura para impedir el crecimiento de organismos marinos que se adhieren. La acumulación de este tipo de organismos (“epibiota”) reduciría el flujo de agua disminuyendo el oxígeno disuelto, y reduciría la durabilidad y su capacidad. La tasa de liberación de productos químicos de la pintura depende del agente tóxico, la temperatura, la velocidad de la corriente de agua y la ubicación física de la estructura. Los ingredientes activos de estas pinturas se disuelven en el agua y podrían tener efectos tóxicos en formas de vida marina a las cuales no están destinadas a afectar, tanto en la columna de agua como en los sedimentos, donde estos químicos tienden a acumularse. En la actualidad, las pinturas a base de cobre son el producto anti-incrustante más utilizado. En efecto, las concentraciones de cobre encontradas en sedimentos cercanos a los sitios son superiores a aquellas recomendadas en las pautas de calidad del sedimento. La toxicidad del cobre en el agua depende en gran medida de la forma química del cobre y de la medida en la cual se enlaza a los diversos ligandos que podrían estar en el agua y que impidan que el cobre entre en contacto con los organismos.

Otros elementos que afectan la toxicidad del cobre son la salinidad y el pH. Los metales como el cobre tienen una solubilidad relativamente baja en el agua y tienden a acumularse en los sedimentos. El factor más crítico respecto de la toxicidad del cobre y de otros metales en los sedimentos, es qué fracción del cobre queda realmente biodisponible, es decir, cuánto puede ser captado por los organismos y por lo tanto, pueda producir efectos tóxicos. Debido a que los sedimentos bajo los cultivos tienden a reducirse, tienen alta demanda de oxígeno y grandes cantidades de sulfuro debido a las fecales de los animales y al alimento no consumido, estos sedimentos registran altas tasas de enlaces con los metales. (Burridge et al., 2007).

Queda constatado que el sulfato de cobre es un compuesto de uso tradicional en la piscicultura por su alto poder biocida; se emplea frecuentemente en la preparación de estanques, pozos de cultivo y desalación (Lloyd, 1992), siendo también ampliamente utilizado en tratamientos terapéuticos (Treves - Brown, 2000). Diversos experimentos de toxicidad han demostrado que los organismos acuáticos son mas sensibles al cobre que a otros iones de metales pesados (Beaumont *et al.*, 1967; D'Agostino y Finney, 1974; Chung, 1978; Redpath, 1985). En las algas, camarones, cangrejos, moluscos bivalvos y peces, la biodisponibilidad y toxicidad del cobre puede ser reducida tanto por la presencia de iones inorgánicos como por los quelantes orgánicos hallados en aguas naturales que forman complejos con el cobre o quelantes inorgánicos agregados al agua (Sunda y Lewis, 1978; Department of Energy, 1987). Los resultados de estudios de toxicidad aguda sobre nauplios de *A. longinaria* demuestran que la mortalidad estuvo en relación directa a la concentración del cobre y tiempo de exposición, lo cual coincide también con nuestros ensayos en nauplios de *Artemia franciscana*.

Los resultados encontrados en la bibliografía corresponden a concentración de 1000 ppb, donde la mortalidad de todos los individuos se produjo durante las primeras 24 horas. En las larvas sobrevivientes, se observaron efectos tóxicos en alteraciones del movimiento natatorio, crecimiento larval y desarrollo. Las larvas presentaron dificultades en el desplazamiento, siendo mas lentas que en el tratamiento control y quedando totalmente inactivas en el fondo, en las altas concentraciones. También el crecimiento larval fue mas lento, las larvas permanecían mayor tiempo en un

estadio particular sin mudar al siguiente, reduciendo el porcentaje de metamorfosis, hecho que también fue hallado en nauplios de *Penaeus stylirostris* a concentraciones inferiores de 0.2 uM (135 ppb) y en *Metapenaeus ensis*, donde a niveles de 0,06 y 0,10 mg Cu/litro (entre 80 y 100 ppb) el desarrollo larval fue significativamente mas lento que en el control (Wong *et al.*, 1995).

Los nauplios de *A. longinaris* en los diferentes tratamientos con sulfato de cobre mostraron dificultades en desprenderse de la cutícula durante la muda, las setas y espinas no se expandían totalmente, presentando un aspecto deforme comparados con el control, características que se presentan en un medio tóxico (Scelzo, 1993). En el tratamiento control, a partir de las 72 horas de experimentación, las larvas comienzan a mudar al estadio de protozoa y todas alcanzan ese estadio a las 96hr de experiencia. Cuando las larvas de los crustáceos son criadas en condiciones ambientales desfavorables o en presencia de sustancias tóxicas, el crecimiento larval se reduce, presentando dificultades en la muda o ecdisis y aparecen malformaciones, especialmente a nivel de las setas furcales. Ello ha sido observado en los nauplios del camarón *A. longinaris*, cultivada en aguas sin tratar con agentes quelantes (Scelzo, 1993). También se ha reportado en las larvas del camarón gigante de Malasia, *Macrobrachium rosenbergii* criado con niveles de toxicidad aguda de nitritos (Armstrong *et al.*, 1976). Existen ciertas afinidades y diferencias en cuanto a los valores de toxicidad hallados en estas experiencias en comparación con nauplios de otras especies.

Salvando diferencias experimentales, Lawrence *et al.* (1981), encontraron 100% de mortalidad en nauplios del camarón *Penaeus stylirostris* de 24hr a concentraciones de 20 uM (1350.8 ppb), valores bastante similares a los hallados en estudios anteriores (100% de mortalidad durante las primeras 24 horas a concentraciones de 1000 ppb) en estas experiencias. Wong *et al.* (1995) indican valores de cobre CL₅₀ (48 horas) que se incrementan en relación directa con el estadio de desarrollo: 0.16 mg/l (160 ppb) para el estadio de protozoa III, 1.58mg/l para mysis III (1580 ppb) y 4.76 mg/l (4760 ppb) para la postlarva 3 de *Metapenaeus ensis*, lo cual demuestra un proceso de

adaptación. Ello podría ser debido además de tratarse de especies distintas, a que fueron experiencias llevadas a cabo en condiciones ambientales diferentes (por ejemplo, temperatura). Es conocido que la absorción de cobre se incrementa en relación directa con la temperatura (Blust *et al.*, 1994) y por otra parte, el contenido de cobre tanto en la hemolinfa como en el hapatopáncreas decrece durante el invierno, como ha sido determinado en *Carcinus mediterraneus* por Devescovi y Lucu (1995). También se ha demostrado que la toxicidad del cadmio y del cobre puede estar más relacionada a la actividad de los iones libres que a la concentración total de los metales (Sunda y Lewis, 1978; Department of Energy, 1987).

A nivel experimental, se emplean varias sustancias quelantes de metales, por ejemplo, EDTA (ácido etilendiaminotetracético) y TRIS (Hidroximetilaminoetano), la presencia de éstos puede reducir o eliminar el efecto negativo de dichos metales (Sunda y Lewis, 1978; Lawrence *et al.*, 1981; Cheng *et al.*, 1987; Department of Energy, 1987). Ello justificaría el uso tan difundido de dichas sustancias en las experiencias de cría y cultivo de organismos acuáticos, garantizando buena calidad de agua, facilitando los procesos de muda en larvas de crustáceos y reduciendo la mortalidad debido a la contaminación (Scelzo, en prensa), dado que el proceso de quelación reduce la concentración de los iones de metales pesados y de esa manera, su posible toxicidad.

En la bibliografía encontrada para otros bioindicadores se recogieron valores de CL_{50} (96h) de 0,546 mg/L Cu^{2+} obtenidos en postlarvas de *C. camentarius* a $20.2 \pm 0.44^{\circ}C$; pH 6.5 ± 0.5 ; dureza 0.9 ± 0.3 mg/L; $CaCO_3$ y salinidad de 1.0 ppt del agua, demuestran que es un estadio muy sensible al cobre (Mendoza Rodríguez, 2007), lo que hace estar de acuerdo con nuestros resultados obtenidos sobre el bioindicador *Artemia franciscana* en lo referente a su también alta sensibilidad. Diversos estudios manifiestan que el grado de toxicidad del cobre depende en gran medida de la dureza, alcalinidad y salinidad presentes en el agua; esta relación inversa se debe a la formación de complejos menos tóxicos con el cobre (Tong *et al.*, 1999).

Burba (1999) encontró que la exposición aguda de cobre en el crustáceo *Astacus astacus*, afectaba negativamente la orientación, reacción e investigación-búsqueda, mientras que la reacción contacto-pelea aumentaba drásticamente volviéndose más agresivos, según Organic Materials Review Institute (OMRI, 2001) estos problemas de actividad locomotora, comportamiento y mortalidad esta relacionado con la desnaturalización de las proteínas celulares de los organismos que ocasiona el sulfato de cobre.

Para la mayoría de los crustáceos decápodos, la principal vía de ingreso al organismo de estos metales es directa, por branquias (Rainbow, 1997; Scelzo, 1997), Lara (2003) menciona que los crustáceos acumulan más metales a bajas salinidades y altas temperaturas, que en aguas saladas o aguas frías, el proceso de muda incrementa la ingestión de calcio y con ello puede incrementarse la tasa de ingestión de metales pesados.

Las respuestas fisiológicas que ocurren en crustáceos expuestos agudamente al cobre entre el rango de 0.1 a 10 mg/L de cobre son: permeabilidad aparente del agua (AWP), actividad cardiaca (CA), actividad enzimática (AZY), concentración de hemocianina (HCY), consumo de oxígeno (MO₂), presión arterial parcial de oxígeno (PaO₂), tasa ventilación/perfusión (V/Q), mientras que una exposición crónica a dosis menores de 0.1 mg/L de cobre produce ultraestructuración de branquias y estrés proteico (Lara, 2003).

2. Fototactismo

Es bien conocido como muchas especies acuáticas exhiben una capacidad fototáctica de reacción positiva cuando se encuentran expuestos a una fuente de luz, habiendo sido estudiadas dichas respuestas en un gran número de organismos, desde la clase *Copepoda* y *Monogenea* (Rothsey and Rohde, 2002) hasta el grupo de dinoflagelados (Eggersdorfer & Häder, 1991; Kamikowski y col., 1999; Evens y col., 2001). En el grupo de organismos que poseen esta capacidad se encuentra la *Artemia*, a la que se le reconoce la capacidad de practicar un movimiento de migración a los puntos de mayor intensidad lumínica existente en su entorno, ejerciendo así sobre ella un fenómeno de fototactismo positivo (Aiken & Hailman, 1978).

Del mismo modo, también han sido estudiados los efectos negativos que, sobre esta capacidad fototáctica, producen distintos aspectos medioambientales. Así, ha sido comprobado como la concentración de sal en el medio llega a afectar negativamente sobre la capacidad fototáctica (Latz & Forward, 1977), e igualmente ha sido descrita la influencia tanto del propio habitat como de la calidad de la luz, siendo factores modificadores del desarrollo fototáctico de los individuos (Lysiak y col., 2002).

A pesar de ello, son escasos los datos referidos en la literatura acerca del factor fototáctico negativo que podrían llegar a provocar distintos contaminantes acuáticos sobre estos organismos, siendo la mayoría referidos a la aparición de dicho efecto negativo provocado por exposiciones a radiaciones ultravioleta (Marangoni y col., 1995; Adams, 2001), y sólo unos pocos quedan referidos a la actuación tóxica de determinados contaminantes. Ya en 1968, Bjornber y Wilbur estudiaron la influencia de determinados colorantes derivados de la xantona en la capacidad fototáctica de distintos copépodos y, por ejemplo, Stearns y Sharp (1994), estudiaron los efectos subletales provocados por cobre en la actividad fototáctica de tres especies de copépodos.

Del grupo de organismos en los que se ha estudiado la influencia de distintos contaminantes acuáticos sobre su capacidad fototáctica, sería destacable la utilización de *Daphnia*, posiblemente por su amplia utilización como biosensor de contaminación en ambientes acuáticos de agua dulce. De esta forma, ha sido posible establecer el efecto fototáctico negativo que supone la exposición de estos organismos al naftaleno (Whitman & Millar, 1982), o la influencia frente a exposiciones con trimetilamina (Lass y col., 2001), y siempre bajo planteamientos para el estudio del efecto de toxicidad subcrónica o crónica. Sin embargo, no ha sido posible encontrar en la literatura ensayos tendentes a la evaluación del efecto negativo de contaminantes acuáticos sobre la capacidad fototáctica de *Artemia*.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo ponen en evidencia la posibilidad de estudio de los efectos negativos sobre la capacidad fototáctica

de larvas de *Artemia* de 24 horas de vida, cuando éstas han sido expuestas a concentraciones subletales de distintos contaminantes, mediante exposiciones de tipo agudo y bajo condiciones de ensayo estático.

Para su consecución, ha sido fundamental la utilización de la cámara oscura desarrollada por nosotros, que ha permitido una valoración precisa de los hallazgos obtenidos en cada una de las experiencias realizadas. Ensayos previos, utilizando técnicas propuestas por otros autores para el estudio de la capacidad fototáctica sobre distintos organismos, no nos permitieron valorar correctamente los resultados obtenidos, generando una amplia dispersión de datos.

Así, la utilización de acuarios revestidos con material plástico opaco, propuestos por diferentes autores como Adams (2001) no permitieron estandarizar el método, fundamentalmente por las amplias diferencias existentes en cuanto al tiempo de migración de las larvas hasta el punto de máxima luminosidad establecido en los ensayos, provocando amplia variabilidad de resultados. Una variante a este método, utilizando vasos de vidrio tal y como proponen otros autores como Evens y col. (2001) o Persaud y col. (2003) presentaban los mismos problemas de análisis de datos, acentuando si cabe aún más el problema de establecer correctamente la distancia a recorrer por las larvas en un determinado tiempo.

La aplicación de metodologías propuestas para estudiar los efectos negativos sobre el fototactismo en *Daphnia* tampoco aportaron buenos resultados, cuando éstos fueron utilizados en larvas de *Artemia*, probablemente porque todos ellos están dirigidos al estudio de la migración vertical de estos organismos. Ensayos previos, utilizando tanto el sistema de *caja negra* con tubo de ensayo vertical, propuesto por Whitman y Millar (1982), como el modelo de simulación para el cálculo de desplazamiento igualmente vertical propuesto por Van Gool (1997) no resultaron idóneos para su aplicación sobre larvas de *Artemia*, provocando una amplia variabilidad en los ensayos control.

Sin embargo, la utilización de la cámara oscura diseñada por nosotros ha permitido obtener resultados homogéneos entre los diferentes ensayos realizados, permitiendo realizar estudios sobre la migración horizontal que exhiben las larvas de *Artemia* y, sobre todo, fijar criterios acerca de la relación entre la distancia a recorrer y el tiempo necesario para ello, consiguiendo unificar estos parámetros de aplicación para todos y cada uno de los ensayos realizados.

Entre estos criterios, el referente al número de larvas óptimo para cada uno de los ensayos en relación al tiempo necesario para que dichas larvas finalizaran el recorrido completo del interior de la cámara, resultó ser primordial en estos ensayos. Como se puede apreciar en la figura (2.1), los experimentos practicados para establecer ambos parámetros, en base a reducir el número de larvas, pusieron de manifiesto una significativa reducción de estas, tiempo-dependiente, hasta llegar a 120 minutos, por encima del cual no aparecían diferencias significativas respecto al número de larvas necesarias.

Los resultados de inhibición del fototactismo sobre larvas de *Artemia* expuestas a concentraciones subletales de los productos seleccionados, indican que todos ellos poseen la capacidad de disminuir la capacidad fototáctica en estos organismos.

Los pocos datos existentes en la literatura, acerca del efecto inhibitor del fototactismo por exposiciones a contaminantes acuáticos evidencian en estudios realizados por Withman (1981), mediante ensayos de fototactismo con *Daphnia magna*, la necesidad de concentraciones mucho menos elevadas de los contaminantes ensayados, para provocar la inhibición fototáctica en el 50 % de la población. Resultados similares fueron obtenidos anteriormente por Southwork y col. (1978) utilizando igualmente en los ensayos *Daphnia magna*. Una comparación entre estos resultados y los obtenidos en el presente estudio parece establecer un mayor rango de sensibilidad de las larvas de *Artemia* de 24 horas de vida que aquella ofrecida por *Daphnia magna*, si bien al no existir datos respecto a los biocidas ensayados, no puede descartarse que el mayor o menor efecto inhibitor del fototactismo esté relacionado tanto con la especie como con el tipo de contaminante ensayado.

VI. CONCLUSIONES

El estudio de letalidad en cada uno de los compuestos activos ensayados revela que, tanto el verde de malaquita como el sulfato de cobre, se comportan como elementos tóxicos para las larvas de *Artemia*,

Los resultados obtenidos frente a la exposición sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de vida indican que el verde de malaquita resultó ser el compuesto más tóxico, con un valor para la CL_{50} de 3.67 mg/l,

Los resultados obtenidos con la exposición sobre larvas de *Artemia* de 48 horas de vida evidencian en cuanto al efecto letal de los compuestos ensayados que aparecen diferencias estadísticamente significativas entre ambos valores de la $CL_{50(24)}$ y la $CL_{50(72)}$ correspondientes al verde de malaquita y el sulfato de cobre, que implican cambios en el orden de efecto letal, de tal forma que en este estadio larvario el verde malaquita continua siendo el elemento más tóxico, con una CL_{50} de 1.67 mg/l.

El mayor efecto letal provocado por el verde malaquita se continúa en los ensayos con larvas de *Artemia* de 72 horas de vida. A este estadio larvario se produce un efecto tóxico provocado tanto por este compuesto (0.11mg/l) como para el sulfato de cobre (7 mg/l),

El estudio comparativo de la sensibilidad de los tres estadios larvarios utilizados aporta la evidencia del aumento de sensibilidad conforme se aumentó el grado de desarrollo larvario, hecho que pudo ser observado en los dos compuestos ensayados.

Los valores de inhibición del fototactismo obtenidos sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de vida ponen de manifiesto que los compuestos utilizados en los ensayos son capaces de disminuir la capacidad fototáctica de las larvas a concentraciones subletales, muy por debajo de los valores correspondientes a sus respectivas CL₅₀.

El verde malaquita ha demostrado ser el compuesto potencialmente más tóxico comparado con el sulfato de cobre, respecto a su capacidad de inhibición de fototactismo, sobre las larvas de *Artemia* de 24 horas de vida, quedando establecida la CL₅₀ en 1.79 mg/l, lo que supone una concentración inferior a la establecida para su correspondiente CL₅₀.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams, N.L. (2001) UV radiation evokes negative phototaxis and coverty behaviour in the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. Marine Ecol. Prog. Series, 213:87-95.
- Aiken, R.B. and Hailman, J.P. (1978) Positive phototaxis of the brine shrimp *Artemia salina* to monochromatic light. Canad. J. Zool., 56:708-711.
- Anderson D.T. 1967. Larval development and segment formation in the branchiopod crustaceans *Limnadia stanleyana* King (Conchostraca) and *Artemia salina* (L.) (Anostraca). Aust. J. Zool. 15:47-91.
- American Public Health Association (APHA). 1991. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17 ed. Washington, D.C. p.81-143.

- Armstrong D.A., Stephenson M.J. y Knight A.W. 1976. Acute toxicity of nitrite to larvae of the giant Malasian prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 9: 39-46.
- Barahona, M.V.; Sanz, F. and Sánchez-Fortún, S. (1994) Acute toxicity of different solvents in *Artemia salina*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 52: 766-771.
- Beattie JH, Pascoe D. 1978. Cadmium uptake by rainbow trout, *Salmo gairdneri* eggs and alevins. *J Fish Biol* 13:631-637.
- Beaumont, A.R., Tserpes G. y Budd M.D. 1967. Some effects of copper on the veliger larvae of the mussel *Mytilus edulis* and the scallop *Pecten maximus* (Mollusca, Bivalvia). *Mar. Environ. Res.*, 21: 299-309.
- Bjornber, T.K. and Wilbur, K.M. (1968) Copepod phototaxis and vertical migration influenced by xanthone dyes. *Biol. Bull.*, 134:398-403.
- Blust R., Van Ginneken L. y Decleir W. 1994. Effeto of temperature on the uptake of copper by the brine shrim, *Artemia franciscana*. *Aquat. Toxicol.*, 30: 343-356.
- Browne RA (1993) Sex and the single brine shrimp. *Natural History*, 102:34-39.
- Burba, A. 1999. The effect of copper on behavioural reactions of noble crayfish *Astacus astacus* L. *Act. Zoo. Lit. Hydrobiologia*, 9(2):30-36.
- Burrridge L., Weis J. Cabello F. Pizarro J. 2007. Uso de productos químicos en la salmonicultura: revisión de prácticas actuales y posibles efectos medioambientales.
- Burrridge TR; Lavery T & Lam PKS (1995) Effects of tributyltin and formaldehyde on the germination and growth of *Phyllospora comosa* (Labillardiere) C. Agardh (Phaeophyta: Fucales). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 55:525-532.
- Castillo, G. (ed). 2004. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IDRC/IMTA. 202p.
- Celso M. Toxicidad del cobre en larvas del camarón comercial *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) *Inv.mar* 1997 vol 25 pag 117-185 ISSN 117 7178.

- Cheng, T.C., A. Mohandas y J.T. Sullivan. 1987. In vivo effects of heavy metals on cellular immunity in molluscs. In: J.V. Dorigan y F.L. Harrison. (eds). *Physiological Responses of Marine Organisms to Environmental Stresses*, pp. 59-62.
- Chung, K.S. 1978. Efectos letales de cadmio, cromo, cobre y zinc en *Nerita fulgurans*. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente, Venezuela*, 17(1-2): 31-33.
- D'Agostino A. y Finney C. 1974. The effect of copper and cadmium on the development of *Tigriopus japonicus*. In: F.J. Vernberg and W.B. Vernberg (eds). *Academic Press. Pollution and Physiology of Marine Organisms*, pp. 445-463.
- Department of Energy, USA. 1987. *Physiological responses of marine organisms to environmental stresses*. Dorigan, J.V. and F.L. Harrison (eds). DOE/ER-0317: 501 pp.
- Devescovi, M. y Lucu C. 1995. Seasonal changes of the copper level in shore crabs *Carcinus mediterraneus*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 120: 169-174.
- Eggersdorfer, B. and Häder, D.P. (1991) Phototaxis, gravitaxis and vertical migration in the marine dinoflagellate *Prorocentrum micans*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 85:319-326.
- Environmental Health Center (1998) *Coastal Challenges: A Guide to Coastal and Marine Issues*. National Safety Council, Washington, 173 pp.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1991. Facts. Potassium Bromide. *Prevention, Pesticides and Toxics Substances*, EPA-738-F-91-105:4 p.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1991. Facts. Sodium and Calcium Hypochlorite Salts. *Prevention, Pesticides and Toxics Substances*, EPA-738-F-91-108:5 p.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1992. Facts. Chlorinated Isocyanurates. *Prevention, Pesticides and Toxics Substances*, EPA-738-F-92-010:5 p.
- Espiritu EQ; Janssen CR & Persoone G (1995) Cyst-based toxicity tests. VII. Evaluation of the 1-h enzymatic inhibition test (fluotox) with *Artemia nauplii*. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 10:25-34.

- Evens T.J.; Kirkpatrick G.J.; Millie D.F.; Chapman D.J. and Schofield O.M.E. (2001) Photophysiological responses of the toxic red-tide dinoflagellate *Gymnodinium breve* (Dinophyceae) under natural sunlight. *J. Plankton Res.*, 23:1177-1310.
- Fariñas, M. Ed. McGraw Hill, Ósmosis Inversa. Fundamentos, tecnología y aplicaciones. 1999. II Congreso Nacional Aedyr. "La Desalación y Reutilización del Siglo XXI". Alicante, 2001.[En CD-Rom]
- Ferguson EA & Hogstrand C. 1998. Acute silver toxicity to seawater-acclimated rainbow trout: Influence of salinity on toxicity and silver speciation. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17:589-593.
- Fisher DJ; Burton DT; Yonkos LT; Turley SD & Ziegler GP. 1999. The relative acute toxicity of continuous and intermittent exposures of chlorine and bromide to aquatic organisms in the presence and absence of ammonia. *Water Res.*, 33:760-768.
- Fisher DJ; Burton DT; Yonkos LT; Turley SD; Ziegler GP & Zillioux EJ. 1994. Acute and short-term chronic effects of continuous and intermittent chlorination on *Mysidopsis bahia* and *Menidia beryllina*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:1525-1534.
- Foster, RB. 1981. Use of Asiatic clam larvae in aquatic hazard evaluations. In: JM Bates and CI Weber (Eds) Ecological assessments of effluent impacts on communities of indigenous aquatic organisms. ASTM STP 730, Philadelphia, 281-288.
- Green DWJ, Williams KA, Pascoe D. 1986. The acute and chronic toxicity of cadmium to different life history stages of the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (L). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15:465-471.
- Green J. 1981. Crustaceans. In: Dales RP (ed) Practical Invertebrate Zoology. MacMillan, London. pp 261-302.
- Hamasaki K. & Hatai K. 1993. Prevention of fungal infection in the eggs and larvae of the swimming crab *Portunus trituberculatus* and the mud crab *Scylla serrata* by bath treatment. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish / Nippon Suisan Gakkaishi*, 59:1067-1072.
- Hutchinson TH, Solbe J, Kloepper-Sams PJ. 1998. Analysis of the ECETOC aquatic toxicity (EAT) database.III- Comparative toxicity of

chemical substances to different life stages of aquatic organisms.

Chemosphere, 36:129-142.

- Iannacone J. Alvaríño L. 2007. Aquatic ecotoxicity of two dyes and three antiparasitics of importance in aquaculture on employing daphnia magna Ecología Aplicada, 6: 1,2.
- Kamykowski, D.; Milligan, E.J.; Reed, R.E. and Liu, W. (1999) Geotaxis/Phototaxis and biochemical patterns in *Heterocapsa* (=Cachonina) illdefina (Dinophyceae) during diel vertical migrations
- Kevan SH, Dixon DG 1996. Effects of age and coion (K⁺ and Na⁺) on the toxicity of thiocyanate to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during pulse or continuous exposure. Ecotoxicol Environ Safety 35:288-193.
- Kusk KO. 1996. Bioavailability and effect of pirimicarb on *Daphnia magna* in a laboratory freshwater/sediment system. Arch Environ Contam Toxicol 31:252-255.
- Lara, M. 2003. Origen, cantidad y destino de metales pesados en langostino del río Marabasco, México. Colima. Tesis Maestría en Ciencias, Universidad de Colima, México. 61p.
- Lass, S.; Boersma, M.; Wiltshire, K.H.; Spaak, P. and Boriss, H. (2001) Does trimethylamine induce life-history reactions in *Daphnia*? Hydrobiologia, 442:199-206.
- Latz, M.I. and Forward, R.B.Jr. 1977. Effect of salinity upon phototaxis and geotaxis in a larval crustacean. Biol. Bull., 153:163-179.
- Lawrence A.L., Fox J. y Castille F,L. Jr. 1981. Decreased toxicity of copper and manganese ions to shrimp nauplii (*Penaeus stylirostris* Stimpson) in the presence of EDTA. J. World Maricult. Soc. 12(1): 271-280.
- Lewis GE. 1995. Testing the toxicity of extracts of Southern African plants using brine shrimp (*Artemia salina*). S. Afr. J. Sci., 91:382.
- Lewis M.A. & Hamm B.G. 1986. Environmental modification of the photosynthetic response of lake plankton to surfactants and significance to a laboratory-field comparison. Water Res., 20:599-609.
- Lewis S; Cartwright NG; Jerman E; Tynan P; Sims IR & Wellstein N. 1994. Proposed environmental quality standards for chlorine in fresh and marine waters. Report for the National Rivers Authority, R&D Note 332.

- Lewis S; Mole N; Mascarenhas R & James H. 1997. Proposed Environmental Quality Standards for Bromine in Fresh and Marine Waters. Report for the Environment Agency. R&D Technical Report p74.
- Lichtfield J.T. y Wilcoxon F. 1949. A simplified methods of evaluation dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Therapeutics, 96: 99-113.
- Lloyd, R. 1992. Pollution and Freshwater Fish. Fishing New Books.
- López J.A., Mejías M. Las aguas salobres. Una alternativa al abastecimiento en regiones semiáridas. Los acuíferos costeros y las desaladoras. Almería, 2000.
- Lydy M.J. & Wissing T.E. 1988. Effect of sublethal concentrations of copper on the critical thermal maxima (CTMax) of the fantail (*Etheostoma flabellare*) and johnny (*E. nigrum*) darters. Aquatic Toxicology 12: 311-322.
- Lysiak, N.S.; Hamp, A.A. and Butler, N.M. 2002. Phototactic behaviour of marine and freshwater copepods as influenced by habitat and light quality. Eos. Trans. AGU, 83:OS146. Ocean Sciences Suppl. Abstract OS22A-166.
- Marangoni, R.; Martini, B.; Puntoni, S. and Colombetti, G. (1995), Effect of UV-irradiation on motility and on phototactic response of *Fabrea salina*. In: Bauer H., Nolan C. (Eds), The effects of environmental UV-B radiation on health and ecosystems, EUR 15607, European Commission Press, Bruxelles, pp. 357-360.
- Martin J.W. 1992. Branchiopoda. In: Harrison FW & AG Humes (eds.). Microscopic Anatomy of Invertebrates vol. 9 Crustacea. Wiley-Liss, New York, pp 25-224.
- McCahon C.P., Pascoe D. 1988. Cadmium toxicity to the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) during the molt cycle. Freshwater Biol., 19:197-203.
- McKim JM. 1977. Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long term toxicity. J Fish Res Board Can 34:1148-1154.
- McKim JM. 1985. Early life stage toxicity tests. In: Rand, G.M. and Petrocelli, S.R. (Eds.) Fundamentals of aquatic toxicology, First edition. Hemisphere Publishing Corporation, New York.

- Mendoza R. 2007 Toxicidad aguda del cobre en postlarvas de camaron de río *Criphypops caementarius* Rev,Peru,biol. 2007 vol 14nº1 pag 53 54 ISSN 1727-9933
- Organic Materials Review Institute (OMRI), 2001. Copper sulfate, as alguicide and invertebrate pest control. (review compiled)-NOSBETAP. 17p.
- Pardi L & Papi F (1961) Kinetic and tactic responses. In: TH Waterman, The Physiology of Crustacea II. Academic Press, New York. pp 365-399.
- Persaud, A.D.; Arts, M.T. and Yan N.D. (2003) Photoresponses of late instar *Chaoborus punctipennis* larvae to UVR. *Aquatic Ecol.*, 37:257-265
- Persoone y col. (1980)
- Persoone, G.; Van de Vell, A.; Van Steertegem, M and Nayer, B. (1989) Predictive value for laboratory tests with aquatic invertebrates: Influence of experimental conditions. *Aquatic Toxicol* 14:149-166.
- Rainbow, P. 1997. Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. *Estuarine, coastal and shelf science*, 44:169-175.
- Redpath, J.K. 1985. Growth inhibition and recovery in mussels (*Mytilus edulis*) exposed to low copper concentrations. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 158: 233-247.
- Sánchez-Fortún, S.; Sanz, F. and Barahona, M.V. (1995) Acute toxicities of selected insecticides to the aquatic arthropod *Artemia Salina*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 54: 76-82.
- Sanders B. y Jenkins K.D. 1984. Relationships between free cupric ion concentration in sea water and copper metabolisms and growth in crab larvae. *Biol. Bull.*, 167: 704-712.
- Sanders B., Costlow J.D., Jenkins K.D. y Marshall T. 1984. The effects of varying cupric ion activities on copper uptake and cytosolic distribution and growth in crab larvae. *Mar. Environ. Res.*, 14: 476-477.
- Scelzo, M. 1997. Copper toxicity in nauplii larvae of the commercial shrimp *Artemisia longinaris* (Crustacea, Decapada, Penaeidae). *Invest. Mar. Valparaíso*, 25:177-185.
- Scelzo, M.A. 1987. Posibilidades del cultivo de camarones y langostinos marinos en Argentina. In: *Panorama de la Acuicultura en la Argentina*. SECYT. Subsecretaría de Coordinación y Planificación. Delegación

Regional Patagonia. CRUB-Univ. Nac. Comahue, Cuadernos Universitarios, 17: 23-34.

- Scelzo, M.A. 1993. Malformaciones en larvas del camarón *Artemesia longinaris*: efectos subletales frente a contaminación y baja calidad de las aguas de los cultivos. In: Seminario Internacional Acuicultura y Medio Ambiente, Fundación Chile, Santiago. Chile, Resúmenes de Posters: pp. 1-2.
- Scelzo, M.A. Efecto del EDTA. (Acido Etilendiaminotetracético) en desoves del camarón *Artemesia longinaris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Frente Marítimo, (en prensa).
- Scelzo, M.A., Lucero N. y Giangioffe M. Toxicidad aguda del nitrito en ejemplares juveniles y preadultos del camarón *Artemesia longinaris* (Decapoda, Penaeidae). Enviado a: Nauplius, Brasil.
- Schimmel SC (1981) Results: interlaboratory comparison-acute toxicity tests using estuarine animals. Final Draft, EPA 600/4-81-003, US EPA, Gulf Breeze, FL:13.
- Shazili NAM., Pascoe D. 1986. Variable sensitivity of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and alevins to heavy metals. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 36:468-474.
- Sleet, RB & Brendel, K: 1985. Homogeneous populations of *Artemia* nauplii and their potential use for in vitro testing in developmental toxicology. Teratog Carcinog Mutagen. 5:41
- Smith SD; Gould RW; Zaugg WS; Harrell LW & Mahnken CVW (1987) Safe prerelease disease treatment with formalin for fall chinook salmon smolts. Prog. Fish-Cult., 49:96-99.
- Snell TW; Moffat BD; Janssen C & Persoone G (1991) Acute toxicity tests using rotifers IV. Effects of cyst age, temperature, and salinity on the sensitivity of *Brachionus calyciflorus*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 21:308-317.
- Stearns, D.E. and Sharp, A.A. (1994) Sublethal effects of cupris ion activity on the phototaxis of three calanoid copepods. Hydrobiologia, 292/293:505-511.
- Stuijzand SC, Poort L, Greve GD, Vandergeest HG, Kraak MH. 2000. Variables determining the impact of diazinon on aquatic insects: taxon,

developmental stage, and exposure time. Environ. Toxicol. Chem., 19:582-587.

- Sunda W.G. y Lewis G.A.. 1978. Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular algae, *Monochrysis lutheri*. Limnol. Oceanogr., 23(5): 870-876.
- Sunda, W.G. y Gillespie P.A. 1979. The response of a marine bacterium to cupric ion and its use to estimate cupricion activity in seawater. J. Mar. Res., 37(4): 511-529.
- Tong, S., Yap, S., Ishak, I. & Devi, S. 1999. Asean marine water quality criterial for copper. ASEAN- Canada CPMS-II. Coop. Programme Marine Science, 41p.
- Treves-Brown K.M. 2000. Applied Pharmacology. Kluger
- Van Gool, E. (1997) Light-induced swimming of *Daphnia*: can laboratory experiments predict diel vertical migration? Hydrobiologia, 360:161-167.
- Viacava M., Aitken S., Llanos J. Estudio del camarón en el Perú. Bol. Inst. Mar Perú, 3(5):1-232.
- Waldichuk, M. 1974. Some biological concern in heavy metals pollution. In: Vernberg, F.J. and W. Vernberg (eds). Pollution and Physiology of Marine Organisms. Academic Press, N.Y.; pp. 1-59.
- Williams KA, Green DWJ, Pascoe D, Gower DE. 1986. The acute toxicity of cadmium to different larval stages of *Chironomus riparius* (diptera: chironomidae) and its ecological significance for pollution regulation. Oecologia 70:362-366.
- Withman, L.J. and Miller, R.J. (1982) The phototactic behaviour of *Daphnia*
- Wong C.K., Cheung J.K.. y Chu K.H. 1995. Effects of copper on survival, development and growth of *Metapenaeus ensis* larvae and postlarvae (Decapoda, Penaidae). Mar. Pollut. Bull., 31(4-12): 416-419.