



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO - FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO AGUDO INDUCIDO POR EL
DESINFECTANTE VIRKON® SOBRE AMBIENTES DE ESTUARIO:
EXPOSICIONES SOBRE LARVAS DE ARTEMIA”.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO EN LA LICENCIATURA DE QUÍMICO –
FARMACOBIOLOGÍA.**

PRESENTA:

P.Q.F.B NALLELY IBETH GUZMÁN DÍAZ

ASESOR DE TESIS:

CARMEN BARTOLOMÉ CAMACHO.

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO.....ENERO 2010



DEDICATORIA:

A MIS PADRES Y FAMILIA:

A QUIENES SIN ESCATIMAR ESFUERZO ALGUNO HAN SACRIFICADO GRAN PARTE DE SU VIDA, ME HAN FORMADO Y EDUCADO. Y LES DEBO TODO LO QUE ACTUALMENTE SOY.

A MI ASESORA Y GRAN AMIGA:

DRA. CARMEN BARTOLOMÉ CAMACHO, A QUIEN GRACIAS A SU EXPERIENCIA, CONSEJOS Y APOYO INCONDICIONAL SE LOGRO LA REALIZACION DE ESTA TESIS, Y QUE EN LO PERSONAL ES UN EJEMPLO HA SEGUIR PARA CRECER PROFESIONALMENTE.

A MI QUERIDA AMIGA:

ANGÉLICA, A QUIEN LE TENGO QUE AGREDECER SU CONFIANZA, APOYO Y SOBRE TODO SU AMISTAD.

AGRADECIMIENTOS:

LOS AUTORES DESEAN EXPRESAR SU AGRADECIMIENTO A FRANCISCO HURTADO POR SU COLABORACIÓN Y ASISTENCIA TÉCNICA. ESTE TRABAJO HA SIDO FINANCIADO POR FHP S.L Y PROMEP
(NUEVOS PTC, PTC-136)

**ESTA TESIS SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DE
“FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA” DE LA FACULTAD DE
QUÍMICO - FARMACOBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD
MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

ÍNDICE

I.- LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
II.-JUSTIFICACIÓN.....	2
III.-HIPÓTESIS DE PARTIDA.....	3
IV.-RESUMEN.....	4
V.-INTRODUCCIÓN.....	6
V.1.BIOCIDAS.....	7
V.2.ALDEHÍDOS.....	9
V.3.ALCOHOLES.....	9
V.4.COMPUESTOS DE AMONIO CUATERNARIO.....	10
V.5.METALES PESADOS.....	11
V.6.COMPUESTOS FENÓLICOS.....	11
V.7.PERÓXIDOS/ DONANTES DE OXÍGENO.....	12
V.8.DERIVADOS HALOGENADOS: YODO, CLORO Y BROMO.....	13
V.9.DESINFECTANTES Y RIESGO AMBIENTAL.....	14
V.10.PELIGROSIDAD DE LOS VERTIDOS DE AGUAS CONTAMINADAS.....	18
V.11.UTILIZACIÓN DE INVERTEBRADOS ACUÁTICOS EN INVESTIGACIÓN ECOTOXICOLÓGICA.....	20
V.12.BIOINDICADOR ARTEMIA FRANCISCANA.....	21
V.13.ARTEMIA FRANCISCANA.....	22

V.14.RELEVANCIA MEDIOAMBIENTAL DE LOS ESTUARIOS.....	38
VI.-OBJETIVOS GENERALES.....	40
VII.-OBJETIVOS ESPECÌFICOS.....	40
VIII.-MATERIAL Y MÉTODO.....	41
IX.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
X.-CONCLUSIONES.....	53
XI.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

I. LISTA DE ABREVIATURAS

- IPCS: Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas.
- CL₅₀: Concentración Letal 50.
- CE₅₀: Concentración Efectiva 50.
- CL_{min}: Concentración Letal Mínima.
- CL_{max}: Concentración Letal Máxima.
- EPA: Agencia de Protección Medioambiental.
- QUATS: Compuestos de Amonio Cuaternario.
- PPM: Partes por millón.
- FDA: Administración de Alimentos y Fármacos.
- OSHA: Oficina de Seguridad y Salud Laboral.
- PEC: Proyecto Educativo de Centro.
- PNEC: Concentración Prevista sin Efectos.
- NOEL/ C: Nivel/ Concentración sin Efecto Observado.
- LOEL/C: Nivel /Concentración con Mínimo Efecto Observado.
- CFR: Code of Federal Regulations.
- OCDE: Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico.

II. JUSTIFICACIÓN

Desarrollar métodos de evaluación ecotoxicológica en ecosistemas marinos y de estuario es una necesidad incluida en el Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (IPCS) de las Naciones Unidas. El desarrollo de la presente tesis se basa en la necesidad de establecer una metodología básica y sencilla para la determinación del riesgo ecotoxicológico, derivado de la utilización de sustancias químicas dentro de las cuales se encuentran los desinfectantes, estos nos permiten una mejora en la obtención de rendimientos mediante diferentes procesos englobados en actividades como son la desalación y la acuicultura. Las sustancias químicas son usadas para un correcto funcionamiento en la obtención de rendimientos dentro de diferentes procesos. La desinfección resulta necesaria para la protección de la salud pública, y así, sucesivas prácticas empleadas han conseguido reducir considerablemente el número de afecciones debidas a la presencia microbiana, mediante el uso de desinfectantes químicos (Fawell y Col., 1997). Sin embargo, la utilización de estos desinfectantes implica la aparición de un grave riesgo sobre la fauna acuática, cuando dichos compuestos son vertidos al medio acuático posterior a su utilización (Boorman y Col., 1999). Toda una sistemática de actuación mediante ensayos toxicológicos ha permitido la conformación de una severa vigilancia que intente preservar a los ecosistemas acuáticos de daños y efectos adversos derivados de los contaminantes, y con ello, se ha ido determinando diferentes modelos para el estudio de la toxicidad. Los bioensayos tradicionales en ratón para conocer la toxicidad de una muestra sospechosa, se van sustituyendo por otros bioensayos y diversos métodos *in vitro* que están demostrando también ser eficaces. El empleo de especies no mamíferas, ofrecen la posibilidad de realización de bioensayos para el estudio de los efectos de compuestos tóxicos directamente en el medio acuático. De entre ellos, la utilización de la *Artemia* o el pez Medaka (*Oryzias latipes*) han sido ampliamente utilizados para estudios de toxicidad aguda y crónica, tanto en su

estado embrionario como en sus formas larvarias, presentándose como organismos biosensores de gran utilidad para estudios de toxicidad en organismos acuáticos. De esta forma, en los últimos años su utilización para la determinación de los efectos de distintos tipos de tóxicos en medios acuáticos está ampliamente aceptada (Crawford & Kocan, 1993; Heath *et al.*, 1993; Holcombe y colaboradores., 1995; Kaur y Col., 1996). Es por ello que en este trabajo hemos utilizado a la *Artemia* como bioindicador, ya que es un crustáceo con amplio rango de salinidad, fácil de criar, económico y comercialmente accesible a sus huevos en cualquier época del año. Multitud de estudios ecotoxicológicos, acerca de la susceptibilidad de diferentes formas larvarias de crustáceos marinos confirman la idoneidad en su utilización 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. (Ward-Booth, K. and M.Reiss 1988).

III. HIPÓTESIS DE PARTIDA

El desarrollo de la presente tesis está basado en la hipótesis inicial de riesgo medioambiental, provocado por la posible presencia de desinfectantes y otras sustancias químicas procedentes de diferentes procesos como la desalación, acuicultura y otros que puedan estar presentes en cursos de aguas superficiales, lagos naturales y artificiales, y zonas de estuario. Estas 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 dulce y salada.

IV.RESUMEN

Los Desinfectantes son preparaciones con propiedades germicidas y bactericidas, es decir, que eliminan microorganismos patógenos. Existen diferentes formulados que vienen siendo utilizados para la limpieza y desinfección de materiales, entre los que se encuentra el producto comercial Virkon[®], marca comercial de Antec International que se ajusta a las características de desinfectante vírico con amplio espectro de acción virucida, bactericida y fungicida, basado en un sistema tamponado de peróxido de hidrógeno ácido y acompañado de un alto porcentaje de surfactante. Según la referencia incluida por el fabricante en los envases, los ingredientes activos técnicos presentes en el compuesto, así como su concentración, son potasio monoperoxisulfato (49.4 %), ácido sulfámico (4.4 %) y sodio alquillico bencémico sulfonato (13.17 %). (Hedgecott, S., Delaney, P., Reynolds, P., 1997).

Aunque la utilización de estos desinfectantes resulta imprescindible para prevenir los efectos sobre la salud pública derivados de la carga microbiana existente en los materiales de uso común, su utilización y posterior vertido pueden significar un grave riesgo sobre el medioambiente, fundamentalmente sobre los ecosistemas acuáticos, lo que implica establecer métodos predictivos para evitar el impacto de estos contaminantes sobre estos ecosistemas. (Brigmann, G., and Kuhn, R., 1979).

De forma general, el principio de prevención medioambiental dominante está basado en la valoración de las descargas de aguas residuales y efluentes, es decir, la reducción de contaminantes específicos (Kinnersley, 1990). Por ello, el Reglamento de la Comisión Europea (1998) y Agencia de Protección Medioambiental (EPA) propone limitar las emisiones de contaminantes en agua residuales para todos los Estados. La aplicación de estas medidas hace difícil una evaluación de los efectos tóxicos de las sustancias, particularmente de aquellos

incluidos en aguas residuales, sobre la estructura de la cadena trófica. Sin embargo, los efectos tóxicos de los contaminantes sobre los organismos acuáticos pueden ser evaluados fácilmente mediante la relación entre las características químicas y los ensayos de toxicidad (Schowanek y Col., 2001; Sponza, 2003).

La exposición de larvas de *Artemia*, crustáceo de agua salada ampliamente distribuido en estuarios donde cumple un papel importante como zooplancton integrante de la cadena trófica marina, a diferentes contaminantes acuáticos viene siendo desarrollado con excelentes resultados desde que en 1975 el Laboratorio de Investigación Biológica en Contaminación Acuática de la Universidad de Ghent (Bélgica) marcara las bases de estudio (Sorgeloos y Col., 1978). En 1981, la metodología queda estandarizada como una prueba en ecotoxicología marina, basado en la obtención de la CL_{50} sobre nauplios II-III de *Artemia salina* (ARC-test), y desde entonces los resultados obtenidos han sido calificados como de satisfactorios (Persoone & Vanhaecke, 1981).

El propósito de este trabajo es valorar el efecto tóxico agudo, provocado por el vertido de este compuesto, sobre ambientes de estuario, utilizando como elemento biosensor a las larvas de *Artemia*.

V. INTRODUCCIÓN

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 el 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 la urbanización masiva de las orillas del mar, de los ríos y 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 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, destruyen la posibilidad del animal para orientarse en el espacio (Helenius, A. and Simons, K., 1975).

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.

V.1.Biocidas

Se conoce con el nombre de biocidas una amplia gama de sustancias capaces de eliminar o controlar la proliferación de microorganismos que pueden provocar alteraciones en los seres humanos, animales y medioambiente. Existen en el mercado diversos tipos de biocidas, que abarcan desde la simple desinfección de hogares hasta especialidades de uso médico. Las distintas familias químicas de compuestos biocidas poseen mecanismos de acción variados, pero todos ellos comparten la características de ser letales a los microorganismos bajo cierta conjunción de circunstancias que hacen de ellos el ser viables para su comercialización (Boorman, G.A., y Col., 1999).

Por pura definición cualquier biocida resultará eficaz, si bien dicha circunstancia será dependiente de la concentración a la que será usada y al tiempo de exposición que requiera para realizar su función. Además de ello, el éxito de un biocida dependerá de la optimización de 5 parámetros en su forma de actuar: Costo, Potencia, Persistencia, Velocidad y Concentración, y por tanto, aspectos como el olor, corrosividad, inestabilidad química de la formulación, toxicidad medioambiental, biodegradación y sensibilidad de los individuos serán los factores que determinen la utilidad de un biocida en particular para una aplicación específica. Por el contrario, las características negativas pueden limitar severamente la utilidad de un biocida que bien pudiera ser un compuesto eficaz. Así, la búsqueda de un equilibrio entre las limitaciones de un biocida y los atributos que le hacen eficaz y seguro, es el desafío constante a la hora de elegir un tipo de biocida. De esta forma, puede llegar a ser necesario el planteamiento de necesidades de tiempos limitados de actuación o, por el contrario una gran persistencia de su efecto para reducir la contaminación y el crecimiento

microbiano. Pero si los factores de velocidad, persistencia y potencia son conseguidos mediante concentraciones altas de los principios activos, entonces es probable que proporcionalmente aumenten los atributos negativos del compuesto, y si la persistencia de actividad debe ser alta, aparecerán inevitablemente los efectos medioambientales adversos y la aparición de alteraciones crónicas entre los individuos expuestos (Enviromental Health Center 1998).

Hoy en día se hacen evidentes los procesos adversos de tipo toxicológico y medioambiental, prácticamente para todos los biocidas existentes en el mercado. Que estos compuestos mantengan su volumen de venta a pesar de los serios inconvenientes que plantean, hace evidente la demanda antimicrobial existente, y de hecho su crecimiento es en parte atribuible a la aparición en el mercado de nuevos productos para los que no se había considerado la necesidad de desinfección, y que ahora se hace indispensable. Sin embargo, cada vez se producen un mayor número de opiniones en contra de la utilización masiva de biocidas que podríamos considerar como tradicionales, y que ha provocado que las empresas que los comercializan se atrincheren en sus propuestas en espera de que remita la presión social. De cualquier forma, se han ido produciendo ciertos cambios, y así por ejemplo, en los últimos 20 años, los derivados fenólicos tuvieron que ceder terreno ante el empuje que suponía la aparición de los formulados a partir de amonio cuaternario, fundamentalmente desde el punto de vista gubernamental y medioambiental. Aunque hoy en día la EPA tiene registrados más de 5000 formulaciones, la lista de formulados agrupados por familias, con principios activos análogos, es bastante corta y quedan agrupados en unas pocas categorías (O.P.P: Office of Pesticide Programs 1995).

V.2 .Aldehídos

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 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 20.000-30.000 ppm 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 1.500 ppm., 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 continuo hacen de él uno de los desinfectantes más vendidos (Boorman, G.A., y Col., 1999).

V.3 .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 acción 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 la formulación 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 (*Mycobacterium*, HIV, etc.). 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 (Boorman, G.A., y Col., 1999).

V.4. 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 700-2000 ppm, 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 (Boorman, G.A., y Col., 1999).

V.5.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 cinc, 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 sociales 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 (Boorman, G.A., y Col., 1999).

V.6.Compuestos Fenólicos

La utilización de los compuestos fenólicos para su uso como desinfectantes proviene 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 la FDA. Hoy en día, estos compuestos son de uso corriente, usándose a concentraciones de 500-1000 ppm, 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. Por el contrario, si se analizan los compuestos fenólicos más benignos, su eficacia también se reduce drásticamente, produciéndose el hecho de ser popularmente utilizados en productos para el hogar (Boorman, G.A., y Col., 1999).

V.7. Peróxidos/Donantes de Oxígeno

El oxígeno, fundamentalmente en aquellas formas reactivas en agua, es un poderoso agente microbiano, 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 30.000 ppm. 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. 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 (Boorman, G.A., y Col., 1999).

V.8. Derivados Halogenados: Yodo, Cloro, Bromo

Los derivados halogenados poseen una amplia historia como agentes antimicrobianos, de tal forma que los últimos estudios estadísticos demuestran que los átomos de cloro y bromo están presentes en la mayoría de las configuraciones 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 desinfección de heridas. El cloro es un biocida de amplio espectro barato y eficaz, que se utiliza en disolución a 500-5000 ppm 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. 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. 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 (Boorman, G.A., y Col., 1999).

V.9.Desinfectantes y Riesgo Ambiental

Según las directivas relativas 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”. Bajo el epígrafe de Desinfectantes y Biocidas Generales, se reconocen 5 tipos:

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) (Fan A., Howd R., Davis B. 1995),

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 medioambiente, y así la normativa europea 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 y los animales, 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, 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 un determinado biocida, puede derivar, en general, de las propiedades y efectos de cualquier sustancia activa o sustancia de posible riesgo presente en un biocida, 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 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, DL₅₀ (dosis letal 50), CL₅₀ (concentración letal 50), CE₅₀ (concentración eficaz 50), CI₅₀ (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) (Boorman, G.A., y Col., 1999).

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. Las especificaciones para los factores de evaluación se elaboran en las notas relativas a la orientación técnica que, a tal efecto, están basadas, en particular, en las indicaciones dadas en la Directiva 93/67/CEE de la Comisión, de 20 de julio de 1993, por la que se fijan los principios de evaluación del riesgo, para el ser humano y el medio ambiente, de las sustancias notificadas de acuerdo con la Directiva 67/548/CEE del Consejo. Para cada compartimento 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/desorción 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 (Boorman, G.A., y Col., 1999).

V.10. Peligrosidad de los vertidos de aguas contaminadas

Tomando como ejemplo las consideraciones realizadas por el Código Federal de Regulación (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, posee 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".

(www2.dupont.com/Crop_Protection/.../Virkon_SDS_210706.pdf 2007)

V.11.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 son evaluados 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 laboratoriales 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 las características propias de 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 (Vanhaecke and Persoone, 1984; Snell and Persoone, 1989a) y otros dos de agua dulce (Snell and Persoone, 1989b; Centeno et al., 1993). 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 costos se reduzcan drásticamente y que el potencial de regulación y precisión del ensayo quede significativamente reforzado (Persoone and Jansen, 1993).

V.12. Bioindicador *Artemia Franciscana*

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 o cutánea. 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. Incluidos en los crustáceos se encuentran el grupo de braquiópodos, primitivo grupo que aún se encuentra en el interior de aguas de lagos salinos, y charcas originadas por nieve derretida o por tiempo húmedo. Las branquias se localizan en los apéndices del tronco (Browne, R.A., y Col., 1993).

Los anostracos son braquiópodos 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 hemocoele. 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. 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 (Cole, G and R.J.Brown 1967).

V.13.Artemia franciscana

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, 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 como bioindicadores. (Persoone and Sorgeloost 1980).

V.13.1.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. 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 nefridioporos. 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. El tórax consiste en once segmentos independientes. No presenta caparazón y ninguno de sus segmentos se encuentran fusionados entre sí; 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 los 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 (Ward – Booth, K. and M.Reiss 1988).

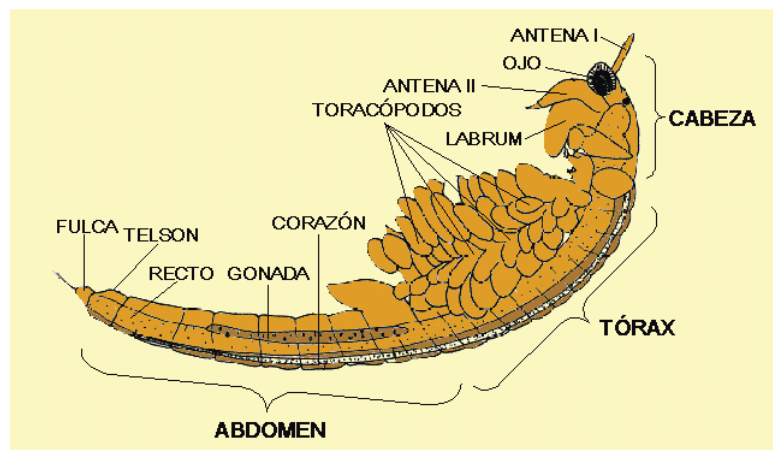


Figura V.13.1.1 Esquema de la anatomía de una hembra de *Artemia franciscana*.

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 (Ward – Booth, K. and M.Reiss 1988).

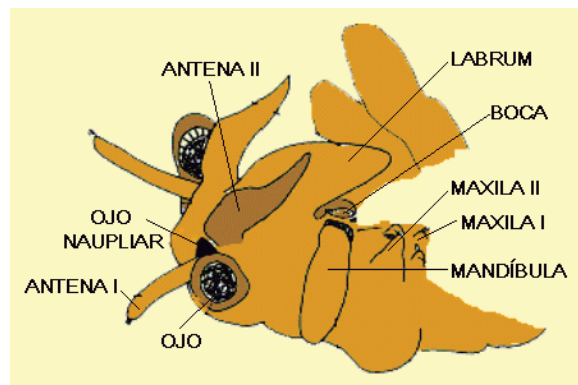


Figura V.13.1.2.Detalle de la cabeza de una hembra de *Artemia franciscana*

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 (Ward – Booth, K. and M.Reiss 1988).

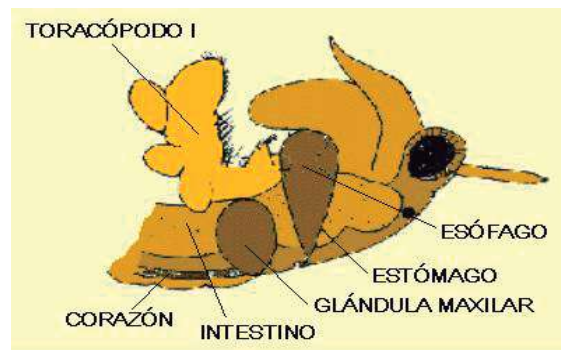


Figura V.13.1.3. Cabeza y tórax anterior de *Artemia franciscana*

El abdomen corresponde a seis segmentos, posteriores al aparato genital, es casi cilíndrico. El final corresponde al *telson* y éste lleva un par de furcas caudales en su fin. Ninguno de los segmentos abdominales llevan apéndices. El ano se localiza sobre el *telson* entre las dos furcas caudales (Ward – Booth, K. and M.Reiss 1988).



Figura V.13.1.4. Tórax posterior y abdomen de una hembra de *Artemia franciscana*

V.13.2 Anatomía Interna

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 hemocoele, 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 (Cole, G., and R.J. Brown 1967).

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 hemocoele 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 el. 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 sonrosada (Cole, G., and R.J. Brown 1967).

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 (Cole, G., and R.J. Brown 1967).

4.- Sistema osmorregulador y Excreción

Existen un par de glándulas maxilares en el segmento de la segunda maxila; éstas se las relaciona 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 hemocele y se baña con la sangre. El epitelio de este fondo de saco se equipa con podocitos 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 (Cole, G., and R.J. Brown 1967).

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, R.A. y Col., 1993).

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 simultaneas. 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 (Pardi & Papi, 1961).

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 porque 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).

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 a 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, y 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. 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, D.T. 1973).

6.1 Periodo de nauplio .Larva 1

Comprende el punto final de la incubación y la eclosión de la artemia, ésta es muy parecida al huevo, mide unas 350 μm , tiene un color pardo anaranjado por acumulación de las reservas vitelinas y presenta un cuerpo corto que comprende los tres primeros segmentos de la cabeza y un tronco corto pero sin segmentación externa. Encontramos un único ocelo, también denominado ojo naupliar, negro o rojo en la cabeza entre el primer par de antenas (Anderson, D.T. 1967).

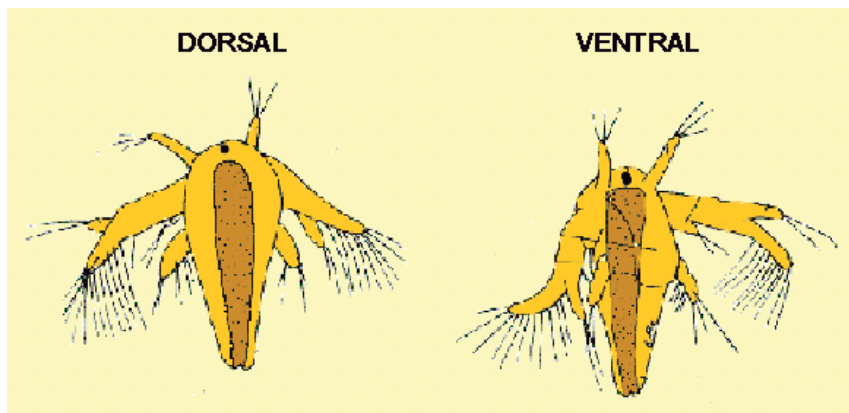


Figura V.13.6.1 Vista dorsal y ventral de un nauplio de *Artemia franciscana*

El cerebro puede ser visible alrededor del ojo de los mayores y a ambos lados de los ojos se levantan dos anténulas todavía sin cutícula, unirramas y relativamente pequeñas las primeras, las segundas son los mayores apéndices de los nauplios y les sirven como órganos natatorios. Las antenas son los primeros órganos de locomoción. Las antenas constan de un protopodio con dos enditos con largas setas, un endopodio con una o dos setas largas y un exopodio que presenta diez setas terminales. El tercer par de apéndices son las mandíbulas que se caracterizan por ser unirramas, también se dividen en protopodio, endopodio y exopodio, respectivamente cada uno presenta dos enditos con una cerda, dos enditos con dos cerdas y el exopodio con tres setas terminales. El *labrum* se extiende entre la segunda antena y las mandíbulas, inmediatamente anterior a la boca, es grande, fino y se alza desde él un pliegue ventral de la pared del cuerpo.

La región postmandibular presenta el ano sin apertura al exterior (en estos momentos no se alimentan porque su aparato digestivo no es funcional, tanto la boca como el ano permanecen cerrados y su nutrición proviene de las reservas del saco vitelino). Se ve insegmentado y sin ningún brote de los miembros. El telson es la parte posterior del cuerpo, contiene el teloblasto a partir de donde se formarán los nuevos segmentos, los segmentos más antiguos se localizan más anteriores y los más jóvenes son los que cierran el telson (Anderson, D.T. 1967).

6.2 Periodo de metanauplio

Se trata de una larva pequeña transparente con un largo tronco; como todavía nada con los apéndices de la cabeza se la sigue considerando un nauplio, aunque el metanauplio incluye varias mudas durante una serie de días que terminan cuando los miembros de la zona anterior del tórax comienzan a ser funcionales, además las reservas del vitelo se agotan y la larva debe comenzar a alimentarse. Anatómicamente la cabeza aparece sin segmentar y está unida al largo tórax, y el final anterior está visiblemente segmentado. El intestino se extiende desde la cabeza hasta la parte posterior del telson, la boca está en la superficie ventral, bajo el *labrum* y entre las bases de las mandíbulas. El estómago es más ancho que el resto del intestino y lo vemos dorsal a la boca que se conecta a él por medio de un esófago en posición vertical. El intestino medio se extiende posteriormente desde el estómago, es relativamente corto y estrecho al principio para aparecer largo al final del estado de metanauplio. El final posterior corresponde la recto este se abre al exterior a través del ano, al final del telson. Los ojos sésiles aparecen en posición lateral, pero requerirán aún muchas mudas para alcanzar su verdadero estado final (Anderson, D.T. 1967).

6.2.1 Larva 2

Difiere en unos pocos caracteres del de L1. Las setas terminales de las antenas y los exopodios de las mandíbulas toman parte en la filtración, y tan solo las antenas contribuyen a la locomoción. La parte postmandibular comienza la

segmentación, dos surcos indican los bordes de las maxilulas y del segmento maxilar (Anderson, D.T. 1967).

6.2.2 Larva 3

En este momento, en la punta de las antenas se desarrollan unas setas más cortas, finas y flageladas, el *labrum* se engruesa, el aparato filtrador aparece más complejo gracias a un engranaje de estrechas sétulas. La región postmandibular se agranda y aparecen los toracómetos I y II y también los brotes de las maxilulas y las maxilas (Anderson, D.T. 1967).

6.2.3 Larva 4

Maxilulas y maxilas se agrandan, algunas cerdas han comenzado a formarse en su punta y la región postmandibular se expande. Los toracómeros II, III y IV se diferencian (Anderson, D.T. 1967).

6.2.4 Larva 5

Se observan elevaciones redondeadas dorsales a las antenas, son el inicio de los ojos compuestos. El *labrum* crece y toma forma de disco, el estoma se abre hacia una posición parantenal, los toracómeros V y VI se segmentan por surcos y aparecen brotes de los futuros miembros. Los toracopodos II y a veces III muestran un comienzo de articulación (Anderson, D.T. 1967).

6.3 Periodo de postmetanauplio

En este periodo se completa el número de somitos del tronco y comienza la transformación de las antenas hacia su forma definitiva y funcional (Anderson, D.T. 1967).

6.3.1 Larva 6

En la punta de cada anténula se ven brotes de la cuarta y setas tipo II, una de ellas comienza a diferenciarse como un fino flagelo. Las sétulas del protopodio

y las cerdas en forma de hoz se reducen esto indica el comienzo de la transformación de estas extremidades. Las mandíbulas disminuyen su talla, las maxílulas y maxilas son activas filtrando partículas de comida. Aparecen los toracómeros VII y VIII en la región postmandibular y los toracópodos I y II ya se ven articulados en su protopodio; los toracópodos III y IV se pueden identificar a nivel de protopodio y enditos mientras que los incipientes miembros de los toracómeros V Y VI carecen aún de articulación. Se delimita un canal ventral por medio de los toracópodos y brotes de los miembros: el canal alimentario. El primer par de extremidades del tronco produce ya corrientes alimentarias, siendo el aparato filtrador el principal responsable de la recogida de la comida (Anderson, D.T. 1967).

6.3.2 Larva 7

Las anténulas ya se caracterizan por un completo suministro de setas, la punta ya tiene la característica organización del adulto y las mandíbulas decrecen. Las extremidades comienzan un desarrollo cuticular para poder producir un tratamiento mecánico en la filtración de comida. Maxílulas y maxilas toman su forma final con las siete a diez cerdas distales (en las siguientes fases sólo crecerán en talla). La región postmaxilar aparece con diez toracómeros. Los toracópodos del I al IV son articulados en un protopodio con seis, tres, y cuatro enditos respectivamente. Los primeros cuatro pares de extremidades del tronco constituyen filópodos activos en la filtración de comida, osmorregulación y respiración. Los epipodios crecen en talla (branquias) (Anderson, D.T. 1967).

6.3.3 Larva 8

Los ojos compuestos se agrandan. El *labrum* cambia a forma trapezoidal. Las antenas disminuyen sus sétulas. En la región postmaxilar se ven delimitados once toracómeros y el primer segmento genital por surcos intersegmentales del tórax que se terminan. El toracópodo V se articula, del VI y VII difieren en el desarrollo de las articulaciones. Los toracómeros VIII al X todavía tienen los miembros sin diferenciar (Anderson, D.T. 1967).

6.3.4 Larva 9

Ante todo se diferencia por algunos cambios morfológicos. El *labrum* lo circunda un borde trapezoidal, la punta de cada antena tiene unas setas que crecen hasta alcanzar la forma de una botella con un poro distal, los incipientes ojos compuestos son protuberantes y la omátida se diferencia, los toracópodos VI y VII finalizan su diferenciación, el octavo y noveno par de extremidades comienzan a articularse y el toracómero XI desarrolla los brotes de sus miembros. En la región abdominal aparece el segundo segmento y tercer segmento genital (Anderson, D.T. 1967).

6.3.5 Larva 10

En este punto la ómatida se multiplica. El *labrum* reabsorbe parte del tejido. Se reducen las setas del borde de los enditos y aumentan las cerdas. Las mandíbulas disminuyen la talla. Los toracópodos VI y VII se llenan completamente de setas para la filtración, los VIII y IX finalizan su articulación y los toracómeros X y XI comienzan la diferenciación de un protopodio y telopodio. Los segmentos abdominales IV y V se delimitan por medio de surcos intersegmentales y cada rama desarrolla tres o cuatro setas (Anderson, D.T. 1967).

6.3.6 Larva 11

Las antenas dejan de tener función locomotora y de filtración, las mandíbulas son extremidades rudimentarias según vamos llegando al estado adulto y la diferencia entre endo y exopodio se hace difícil. Los toracópodos X y XI se articulan, las extremidades de los toracómeros VIII y XI completan su llenado de setas filtrantes. El abdomen desarrolla sus segmentos VI Y VII y lo mismo ocurre dorsalmente en el tronco. Los segmentos abdominales III y IV comienzan la formación de un par de setas en su superficie ventral (Anderson, D.T. 1967).

6.3.7 Larva 12

Ya el borde del labio se encuentra casi completamente reabsorbido, el *labrum* forma una especie de lengua, las setas terminales de las antenas se

deterioran, las mandíbulas aparecen como un resto de tejido semejante a un botón. Los toracópodos X y XI completan su llenado de setas filtradoras y el segmento abdominal VIII y telson se separan por un surco; cubiertos por los toracópodos los brotes de los penes aparecen como hinchazones globulares en la porción ventral del segmento genital, mientras que el saco ovárico se construye por la fusión del tejido de los lóbulos ventrales de los dos segmentos genitales (Anderson, D.T. 1967).

6.4 Periodo postlarval

Comprende cinco estadios donde se desarrollan las antenas y las estructuras genitales principalmente (Anderson, D.T. 1967).

6.4.1 Larva 13 (Artemia juvenil)

Los ojos compuestos multiplican su extensión y una especie de tallos empiezan a distinguirse. Las antenas comienzan a tomar la posición ventro-lateral y las cerdas terminales se reducen. El brote del pene y el rudimentario saco ovárico se agrandan (Anderson, D.T. 1967).

6.4.2 Larva 14

La lengua toma la forma definitiva y el *labrum* también. Los tallos de los ojos avanzan en extensión. El protopodio de las antenas toma su posición ventral final. Los endopodios son finas láminas en la base del exopodio. En la cara interna de cada antena los machos tienen un rudimento frontal que se desarrolla y las porciones basales de los exopodios de las antenas en ambos sexos están provistas con setas semejantes morfológicamente a las de los segmentos del tronco. Los sacos ováricos y los penes aumentan su talla y los genitales de los machos muestran orificios diferenciados de vasos. El surco intersegmental de la porción ventral que separa los segmentos genitales se reduce y el segmento ventro-lateral se fusiona (Anderson, D.T. 1967).

6.4.3 Larva 15

Los machos ya presentan el exopodio antenal en forma de hoz, tanto en éstos como en hembras las antenas están enlazadas juntas por un tejido basal que cubre también el *labrum* en su parte basal. El muñón frontal del macho inicia la formación de espinas cuticulares. El endopodio decrece en talla (Anderson, D.T. 1967).

6.4.4 Larva 16

Una parte de la superficie dorsal cefálica forma un surco cervical, unido a la parte basal de la articulación mandibular. Su función será sostener tendones y músculos. Los exopodios de las antenas de los machos desarrollan una articulación secundaria, el muñón frontal se agranda y aparecen espinas cuticulares y rudimentarios mecanorreceptores. Tanto machos como hembras sufren un aumento del número de setas y los endopodios de las antenas desaparecen (Anderson, D.T. 1967).

6.4.5 Larva 17

En este estadio las diferencias con el estado adulto son muy pequeñas. Los tallos de los ojos compuestos se extienden, los exopodios de las antenas de los machos aumentan rápidamente en tamaño formando como una especie de pinzas, el muñón frontal desarrolla espinas ramificadas o no y se agranda, estas espinas pueden ser solitarias o ir en pareja. Algunos a nivel lateral sobre las extremidades pueden mostrar tejido remanente de las mandíbulas. Los genitales se expanden, los sacos ováricos forman una espina y una especie de broche en cada lado. La muda correspondiente a este estadio finaliza el desarrollo en ambos sexos y se obtiene la organización adulta. Los adultos miden hasta 10 mm de longitud en las poblaciones bisexuales y hasta 20 mm en las poblaciones parternogenéticas. Los adultos se caracterizan por un cuerpo alargado con dos ojos compuestos pedunculados, un aparato digestivo lineal, unas anténulas sensoriales y 11 pares de toracópodos funcionales. El macho posee un par de piezas prensiles musculosas y muy características (segundo par de antenas) en la región cefálica

mientras que en la parte posterior del tórax se pueden observar un par de penes. La hembra no tiene apéndices distintivos en la región cefálica, pero puede ser fácilmente reconocida por el saco ovígero localizado inmediatamente detrás del undécimo par de toracópodos. Como ya ha sido comentado, los huevos se desarrollan en dos ovarios tubulares situados en el abdomen. Una vez maduros, los oviductos son visibles (también se denominan sacos laterales). La precópula de los adultos se inicia cuando el macho sujeta a la hembra entre el ovisaco y el último par de toracópodos, con sus antenas modificadas y curvadas. Las parejas pueden nadar durante largo tiempo a lo que se conoce como paseo nupcial, para ello mueven sus toracópodos de forma sincrónica. La cópula es un rápido acto reflejo: la parte ventral del macho se dobla hacia delante y uno de los penes es introducido en la abertura del útero fertilizando a los huevos. En el caso de las hembras preternogenéticas ésto no ocurre y el desarrollo embrionario comienza tan pronto como los huevos han llegado al útero (Browne, R.A.1992).

La reproducción puede ser: ovovivípara, los huevos fecundados se desarrollan normalmente a nauplios nadadores que son depositados por la hembra. En condiciones extremas las glándulas de la cáscara (órganos localizados en el ovisaco y que son parecidos a uvas), entran en actividad y acumulan un producto de color marrón (henmatina). Los embriones sólo llegan hasta un estado de latencia siendo liberados por la hembra, es la reproducción ovípara. Los quistes flotan en el agua hipersalina y son llevados hasta orillas donde se acumulan y se secan. Ante condiciones de nuevo adecuadas, el mecanismo de día/pausa se desactiva y los quistes pueden recuperar su desarrollo embrionario. En condiciones adecuadas, esta especie puede vivir varios meses, creciendo de nauplio a adulto tan sólo en 8 días y reproduciéndose a una tasa de hasta 300 nauplios en cuatro días (Browne, R.A. y Col., 1993).

V.14. Relevancia medioambiental de los Estuarios

Un estuario es un cuerpo de agua parcialmente encerrado que se forma cuando las aguas dulces provenientes de ríos 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. La variedad de hábitats de estuario 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 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 y otras aguas costeras, y así, en términos generales, los estuarios proveen hábitat para más del 75% de los peces comerciales y el 80-90% de los recursos de la pesca recreativa (Day JR, CA Hall, WM. Kemp and A Yañez-Arancibia 1989).

La presión que se ejerce sobre ellos, y muy especialmente la contaminación hídrica, está perturbando el balance natural de los ecosistemas de estuario 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).

V.14.1 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 (Persoone y Sorgeloost 1980).

Multitud de estudios ecotoxicológicos, acerca de la susceptibilidad de diferentes formas larvarias de crustáceos marinos confirman la idoneidad en su utilización (Conklin and Rao, 1982; Kaur and Dhawan, 1983; 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.

VI. OBJETIVOS GENERALES

Las sustancias químicas empleadas en diferentes procesos pueden llegar a provocar severos daños a la fauna acuática presente en ecosistemas, por lo que resultaría fundamental mantener un protocolo de control para evitar la aparición de daños sobre estos organismos. El efecto toxicológico puede traducirse 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.

VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Atendiendo a los antecedentes descritos en relación con la problemática medioambiental que surge, derivada del riesgo que supone para la biota la presencia de biocidas desinfectantes en el medio acuático, con el presente trabajo de investigación se pretende alcanzar los siguientes objetivos:

- Determinar el riesgo toxicológico de tipo agudo que se pueda derivar de la presencia de los biocidas seleccionados en ambientes acuáticos de agua

salina, mediante la exposición de éstos frente a larvas de *Artemia* como organismos presentes en ambientes de estuario y aguas salubres.

Para desarrollar este modelo, es necesario plantear objetivos parciales, que en esencia son:

Establecer el riesgo derivado de la presencia de este desinfectante en las poblaciones de *Artemia*, con el fin de establecer predicciones acerca de la disminución de alimento básico para la población de peces en el medio, mediante la valoración en *Artemia* como elemento fundamental de la cadena trófica en muchos ecosistemas acuáticos de elevada salinidad, estableciendo los límites de riesgo, a través de la valoración y control de los niveles de desinfectante a través de estos crustáceos.

La obtención de resultados positivos sería de gran importancia, tanto para validar aún más este modelo, como para aportar datos específicos (relación concentración-respuesta) de cara a la puesta en marcha de la técnica como modelo habitual de control.

VIII. MATERIAL Y MÉTODO

Compuesto químico utilizado

Fue seleccionado en función de su capacidad como desinfectante para los problemas usuales en las plantas desaladoras, producción acuícola y la desinfección de materiales.

Virkon[®] es marca comercial de Antec International, y se ajusta a las características de desinfectante vírico con amplio espectro de acción virucida, bactericida y fungicida, basado en un sistema tamponado de peróxido de

hidrógeno ácido y acompañado de un alto porcentaje de surfactante. Según la referencia incluida por el fabricante en los envases, los ingredientes técnicos presentes en el compuesto, así como su concentración, son los siguientes:

- Potasio monoperoxisulfato: 49.4 %.
- Acido sulfámico 4.4 %.
- Sodio alquílico bencémico sulfonato 13.17 %.

Características: polvo color rosa, de olor agradable, dulce con las siguientes propiedades químicas: pH: 2,4 - 2,7, Punto de inflamación: no se inflama, Densidad relativa: 1,07 Hidrosolubilidad: 65 g/l a 20 °C.

Aplicaciones: es usado como desinfectante en desaladoras y estanques, habiendo demostrado una excelente actividad contra una gran variedad de patógenos que afectan a la producción acuícola. En acuicultura de camarón está indicado contra problemas de vibriosis y como prevención de enfermedades virales como “mancha blanca” (WSSV), “cabeza amarilla”(YHSV) o virus taura. Y también es utilizado como desengrasante.

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. 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.

Obtención de *Artemia franciscana*

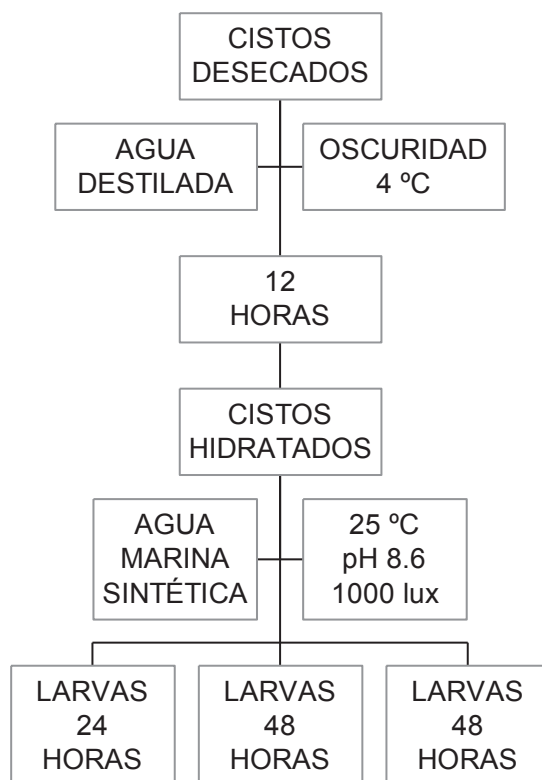
La obtención de larvas de *Artemia franciscana* se practicó a partir de huevos desecados obtenidos de Argent (Argent Chemical Laboratories, Washington, USA) y utilizando la línea *ARGENTEMIA Grade II Silver Label*, línea procedente del *North Arm Great Salt Lake* (USA) y que garantiza un mínimo de 260.000 huevos/gr, de los cuales más de un 92 % eclosionarán en un intervalo para el tiempo de inducción de mínimo (T_0) 9 horas y máximo (T_{90}) 16 horas, obteniendo así poblaciones homogéneas de nauplios, de las que al menos un 80 % tenían un tamaño de 500-525 μm . 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 eran 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 pH de 8.6, y al que se aplicaba una fuente de luz de aproximadamente 1000 Lux. A 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 huevos, y transcurridas 20 horas desde que los huevos eran incubados en el medio salino reconstituido se obtenía una amplia población de nauplios libres. Dichos nauplios eran transferidos a placas de Petri con medio salino reconstituido, a 25 °C y aireación. Bajo estas condiciones, 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.

Figura VIII.1. Esquema de la obtención de larvas de *Artemia* a partir de cistos deshidratados (Nota: este trabajo se realizó en estadíos de 24 horas).



Estudios de Toxicidad Aguda: Letalidad

1.-Distribución de larvas de *Artemia*

Las larvas de *Artemia* obtenidas, según los estadíos de desarrollo larvario estudiados, fueron distribuidas en un conjunto de 10 individuos por cada uno de los 24 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 a su traslado, bajo lupa binocular, para asegurarnos de que cada pocillo poseía el número exacto de larvas.

Para la realización de la posterior exposición al biocida ensayado, la columna 1 de la placa multipocillos quedaría reservada para los estudios control (sin exposición al compuesto), y en los estudios con virkon, la columna 2 se reservaría para los estudios control del solvente utilizado, siendo en este caso acetona.

2.- Exposición de las larvas al biocida

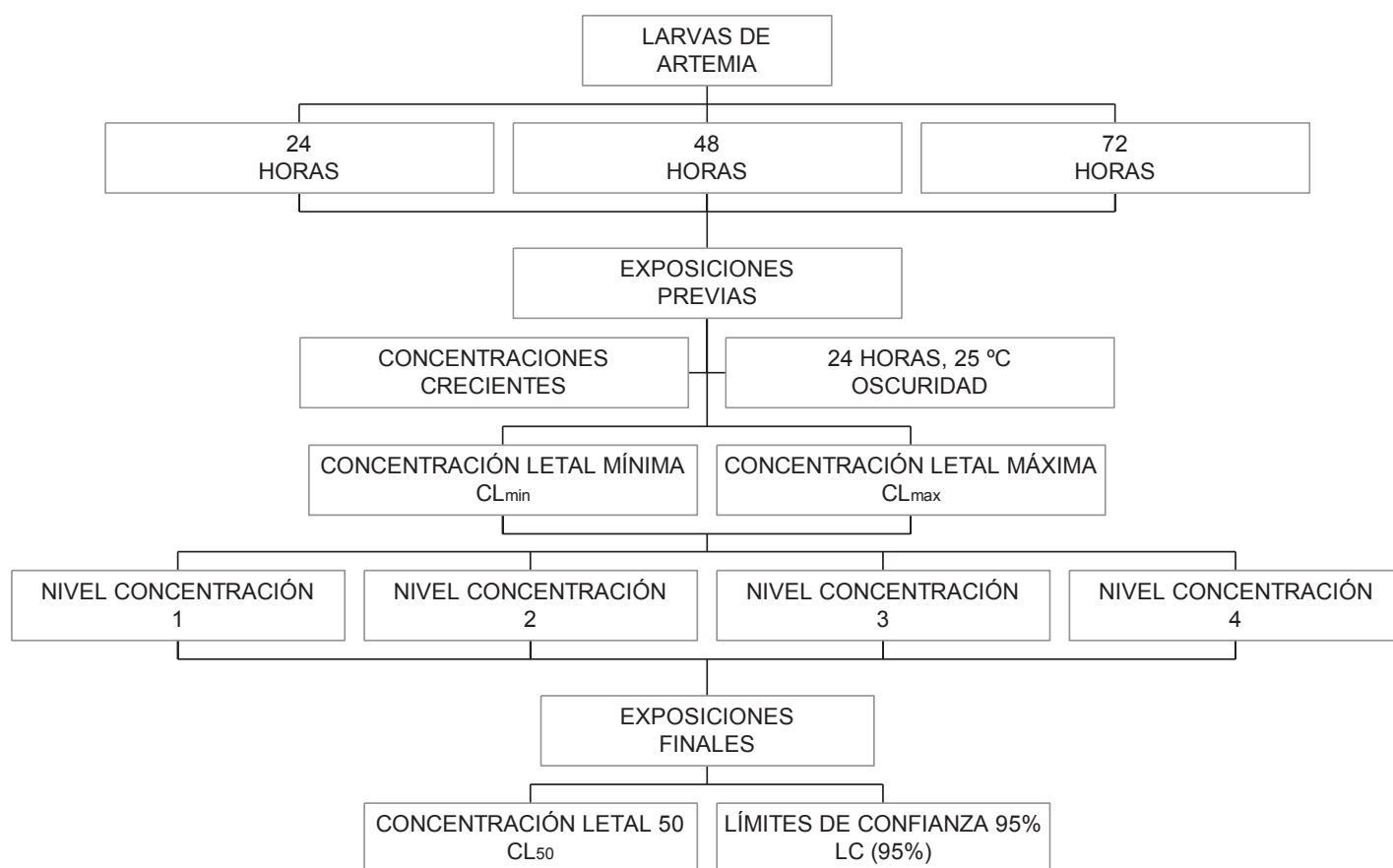
2.1 Exposiciones previas

Con el biocida ensayado 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 crecientes de cada uno de los biocidas ensayados. Así, con posterioridad a la exposición, las placas multipocillo eran incubadas a 25 °C en una cámara de cultivo, en ambiente de oscuridad 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.

Para la validación de cualquier ensayo realizado, era necesario que los datos obtenidos en las columnas control, tanto control negativo como control del solvente en su caso, fueran iguales o superaran el 90 % de supervivencia de larvas, descartando todo aquel ensayo que no superara este requisito.

De esta forma, se obtuvieron las correspondiente CL_{min} y CL_{max} correspondientes al estadio larvario (24horas de vida) y en el biocida ensayado, la máxima concentración ensayada capaz de no provocar efecto letal a ningún individuo expuesto en los cuatro 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 cuatro 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.

Figura VIII.2.1.1 Esquema de la realización de los ensayos de letalidad con larvas de *Artemia* (Nota: solo de 24 horas)



2.2 Exposiciones finales

Una vez establecidas las correspondientes CL_{min} y CL_{max} , se practico la correspondiente exposición al biocida al estadio larvario con el cual queremos trabajar, aplicando un total de 5 concentraciones dentro del rango establecido, que corresponderían a las columnas 2, 3, 4, 5 y 6 de la placa multipocillos, y reservando a la columna 1 como control, para el estudio de letalidad sobre Virkon,

Las condiciones de ensayo se practicaron de igual modo a como fueron realizadas para los ensayos preliminares, realizando un total de 8 réplicas.

Expresión de los Resultados

La letalidad es expresada como Concentración Letal 50 (CL_{50}) junto a sus límites de confianza al 95 % (CL 95 %), de acuerdo con la metodología de Litchfield y Wilcoxon (1949), desarrollada por el programa estadístico Pharmacologic Calculation System (PCS versión 4.0, New York). Para efectos estadísticos, todas las pruebas fueron repetidas 8 veces ($n=8$).

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos tras la aplicación del producto a la concentración indicada por el fabricante (dilución 1:100) provocaron la muerte de todos los nauplios de *Artemia salina*. Si bien la observación de la experiencia se practicó según metodología, es decir, pasadas 24 horas, el estudio morfológico de los nauplios revela que los organismos no han desarrollado las mudas correspondientes al tiempo de exposición, por lo que cabe deducir que la letalidad se produjo en un tiempo muy corto tras la exposición al producto.

La aplicación en los ensayos de concentraciones crecientes del formulado ha permitido obtener un valor de CL_{50} de 81.81 (60.57-107.82) mg/l, lo que representa una concentración considerada como poco tóxica a la hora de

evaluar los efectos tóxicos de tipo agudo provocados por efluentes (USEPA, 1991).

El análisis de regresión lineal de los resultados obtenidos en exposiciones a diferentes concentraciones del compuesto queda reflejado en la Figura 1.

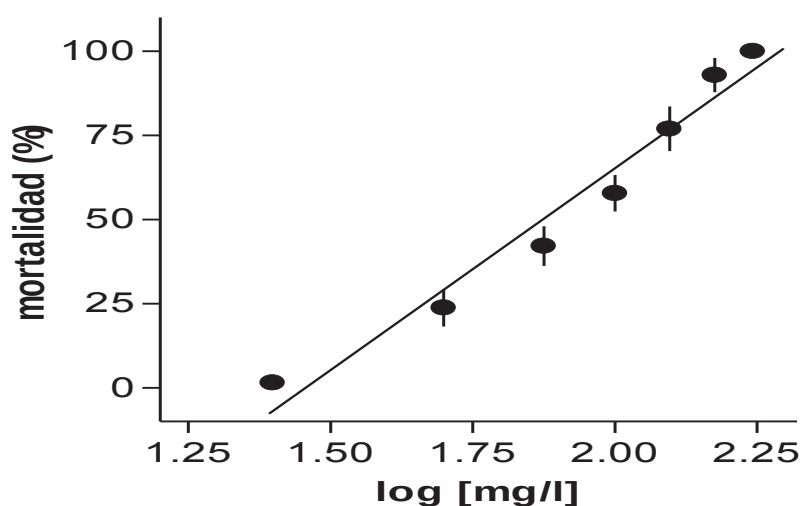


Figura 1. Análisis de regresión lineal correspondiente a los porcentajes de letalidad en larvas de *Artemia* obtenidos a 24 horas de exposición al producto comercial Virkon®.

Según la clasificación de toxicidad aguda propuesta por la OCDE y la 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 el biocida

estudiado, se encuadrarían dentro de los de clase III correspondiente a contaminantes de baja toxicidad.

Estos resultados indican que las larvas de *Artemia* presentan una menor sensibilidad que otros organismos acuáticos, cuando son expuestos a Virkon®. Así, el valor de $CE_{50(48)}$ obtenido frente a exposiciones sobre *Daphnia magna*, crustáceo de agua dulce, fue de 6.5 mg/l (Hedgecott y Col., 1997), claramente inferior al obtenido por nosotros. La comparación entre ambos organismos parece indicar importantes diferencias de sensibilidad entre organismos de agua dulce y agua salada, fundamentalmente influenciadas por factores como el pH y la salinidad del medio, y así aparecen datos en la literatura que demuestran como los valores de toxicidad en organismos acuáticos están influenciados por el grado de salinidad del medio, y como diferentes organismos acuáticos de ambientes salinos, como la *Artemia*, poseen una gran capacidad de osmorregulación que contribuye a presentar una mayor resistencia frente a los contaminantes (Inman y Lockwood, 1977; Ferrando y Andreu-Moliner, 1991). Pese a ello, resulta importante establecer una batería de ensayos toxicológicos con organismos biosensores de ambientes acuáticos de alta salinidad para determinar el impacto de estos biocidas sobre ecosistemas marinos y de estuario.

La comparación de la toxicidad aguda sobre larvas de *Artemia* entre el compuesto Virkon® y otros desinfectantes de amplia aplicación ha puesto en evidencia que éste, por lo general, provoca menor impacto sobre los ecosistemas acuáticos de alta salinidad que el resto. En general, los principales formulados utilizados para limpieza y desinfección presentan toxicidades más altas que Virkon® sobre diferentes especies de ambientes marinos (Liao y Guo, 1990; OPP, 1995; Utsonomiya y Col, 1997). Específicamente en estudios realizados mediante exposiciones de cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosfonio frente a larvas de *Artemia salina* establecieron una CL_{50} de 1.99-2.52 mg/l (Espíritu y Col., 1995). Por el contrario, las larvas de *Artemia* han resultado ser más sensibles a Virkon® que a otros desinfectantes como el peróxido de

hidrógeno, con un valor de CL_{50} de 920 mg/l (Matthews, 1995), o al bromuro de sodio que se presenta como prácticamente atóxico en los ambientes acuáticos (USEPA, 1999).

Haciendo un estudio comparativo con resultados de letalidad a diferentes tiempos de exposición sobre alevines de pez Medaka, (se incluyen en la Tabla 1). La aplicación del Test de Duncan sobre los experimentos indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos en cada uno de los 4 experimentos realizados. El análisis de estos datos indica un aumento progresivo concentración-dependiente de la toxicidad de la sustancia problema estudiada.

En las primeras 4 horas de exposición aparece un alto grado de toxicidad a las concentraciones superiores, siendo del 100 % de letalidad para 40 mg/l, 70 % para 30 mg/l y 40 % para 20 mg/l. A concentraciones menores no se producía letalidad.

Los valores de CL_{50} junto con los límites de confianza al 95 % queda establecida en 21.2 (17.79-25.25) mg/l para exposiciones de 24 horas de duración ($CL_{50(24)}$). Este valor resulta ser significativamente menor a los obtenidos en ensayos de toxicidad aguda con trucha arcoiris (*Oncorhynchus mikis*), en los que quedó establecida una $CL_{50(96)}$ de 53 mg/l, lo que supondría una mayor sensibilidad de los organismos empleados frente a exposiciones de este desinfectante, si bien los valores obtenidos resultan más altos que los obtenidos para otras especies acuáticas, como por ejemplo *Daphnia*, donde quedó establecida una concentración eficaz 50 ($CE_{50(48)}$) de 3.5 mg/l (Hedgecott y Col., 1997) La aplicación del análisis estadístico (Test de Duncan) indica que no existen variaciones significativas entre los datos obtenidos tras la exposición a 24, horas.

La previsible evolución de la toxicidad es presentada en la Figura 1. Los datos obtenidos en la experiencia fueron tratados mediante un análisis de

regresión lineal, con la generación de las respectivas rectas según el periodo de exposición analizado.

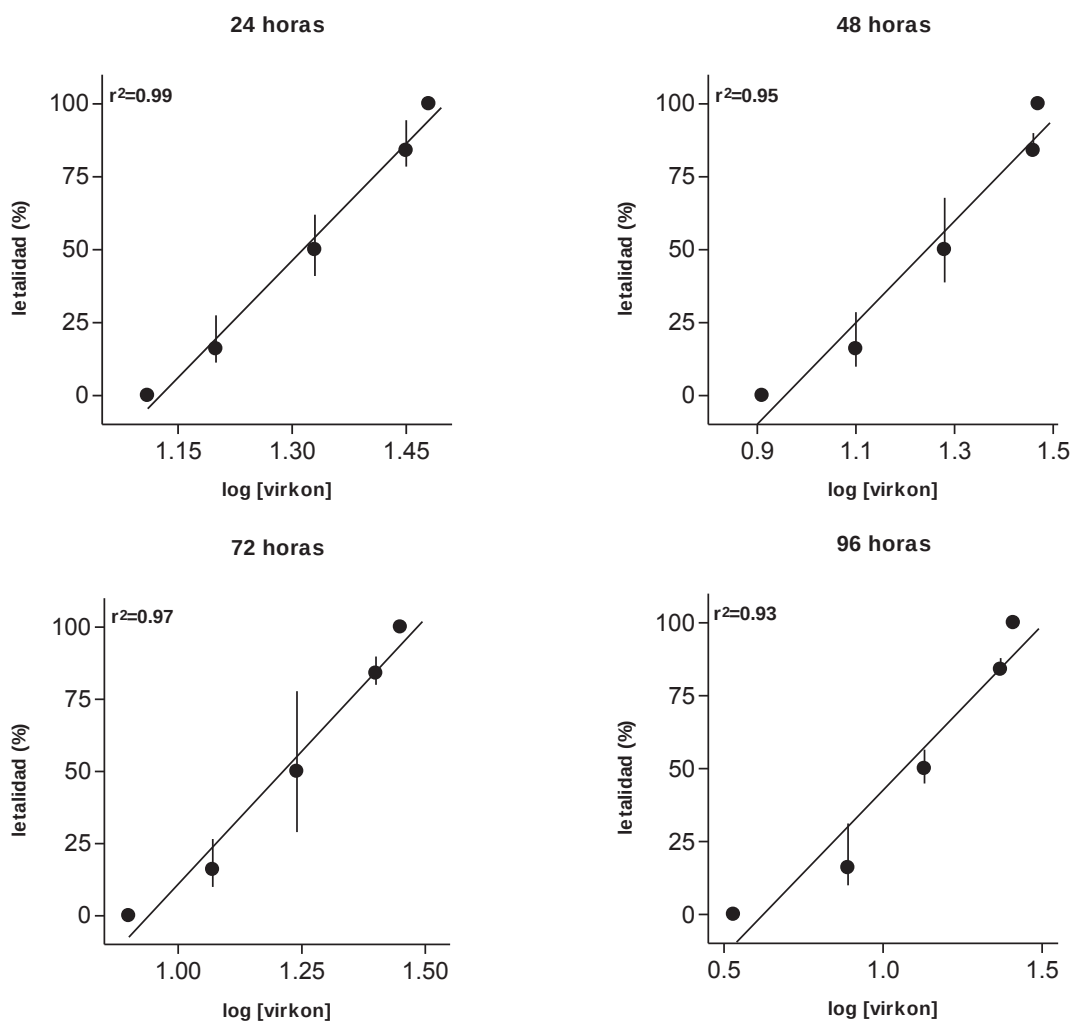
El estudio de las posibles anomalías visibles dieron como resultado la existencia de dificultad respiratoria, en mayor o menor grado, de la mayoría de los alevines en las exposiciones a las concentraciones más altas estudiadas y al principio de la exposición. Sin embargo, dicha dificultad respiratoria es transitoria y no se mantuvo en los alevines supervivientes del ensayo, lo que resultó normal teniendo en cuenta el carácter tensioactivo de la sustancia problema. El grado de dificultad respiratoria obtenido en estos ensayos es similar al observado por otros autores (Smits A. W. y Col., 1994) en ensayos de toxicidad de surfactantes con otras especies piscícolas, estableciendo una relación entre estos compuestos y la reducción de la tensión superficial del medio acuático. Adicionalmente, los cambios de permeabilidad de membrana en las agallas de los peces, observados en las exposiciones a surfactantes (Helenius and Simons 1975) podrían ser un elemento determinante a la hora de valorar este efecto adverso observado.

Los resultados obtenidos en el trabajo indican que el producto comercial Virkon® presenta una baja toxicidad aguda para peces, y puede ser clasificado como sustancia poco tóxica (según clasificación ecotoxicológica de E.P.A.) en su exposición medioambiental acuática sobre alevines de medaka (*Oryzias latipes*). (M.C.Bartolomé ,S.Sánchez Fortún 2006) al igual que ocurre con los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

Tabla 1. Valores de concentración letal 50 (CL₅₀), con sus correspondientes límites de confianza al 95 % (LC 95 %), obtenidos mediante la exposición al desinfectante Virkon® de alevines de medaka (*Oryzias latipes*), a diferentes tiempos de exposición.

		CL ₅₀ (LC 95 %)			
COMPUESTO	N	(mg/l)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Virkon®	4	21.2 (17.79-25.25)	18.96 (15.78-22.78)	17.38 (14.72-20.52)	13.43 (11.02-16.36)

Figura 1. Análisis de regresión lineal correspondiente a los porcentajes de letalidad en alevines de medaka (*Orizias latipes*) obtenidos a 24, 48, 72 y 96 horas de exposición al producto comercial Virkon®.



X.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que la presencia del compuesto Virkon® en los efluentes vertidos en ambientes de estuario representa un bajo riesgo toxicológico a corto plazo para la biota presente en dichos ecosistemas, y que el impacto que supone su presencia sobre larvas de *Artemia* y alevines de pez Medaka es lo suficientemente reducido como para no esperar que dichos efluentes puedan modificar significativamente la cadena trófica en estos ambientes.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Anderson, D.T. (1973) Embryology and Phylogeny in Annelids and Arthropods, Pergammon Press, NY, 495 pp. [ISBN: 0080170692]
- ❖ Anderson, D. T. (1967) Larval development and segment formation in the branchiopod crustaceans *Limnadia stanleyana* King (Conchostraca) and *Artemia salina* L. (Anostraca), Australian Journal of Zoology, 15:47-91.
- ❖ Barahona, M.V., Sanz, F. and Sánchez-Fortún, S. (1994) Acute toxicity of organic solvents on *A. salina*. Bull Environ Contam Toxicol 52:766-771.
- ❖ Bartolomé ,M.C Sánchez Fortún S 2006. A VIRKON fertőlenítőszer akut toxicitása orizyas latipes halivadékokon Acta Scientiarum Socialum XXI-XXII: pp167-172
- ❖ Boorman, G.A.; Dellarco, V.; Dunnick, J.K.; Chapin, R.E.; Hunter, S.; Hauchman, F.; Gardner, H.S.; Cox, M.& Sills, R.C. (1999) Drinking water disinfection by-products: review and approach to toxicity evaluation. *Environ. Health Perspect.*, 107s:207-217.
- ❖ Bowen, S. T., M. R. Buoncristiani, and J. R. Carl. 1988. *Artemia* habitation concentrations tolerated by one superspecies. *Hydrobiologia* 158:201–214. CrossRef
- ❖ Brantestam, A. K., R. Von. Bothmer, C. Dayteg, I. Rashal, S. Tuveesson, and J. Weibull. 2004. Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity and relationships in cultivated barley of Nordic and Baltic origin. *Hereditas* 141:186–192. CrossRef, PubMed.
- ❖ Brigmann, G & Kuhn, R. (1979) .The toxic effects of waste water on aquatic bacteria, algae, and small crustaceans. *Gesund Ing.*, 80:115-120.
- ❖ Browne, R. A. and C. W. Hoopes. 1990. Genotype diversity and selection in asexual brine shrimp (*Artemia*). *Evolution Int. J. Org. Evolution* 44:1035–1051. CSA

- ❖ Browne, R. A. 1992. Population genetics and ecology of *Artemia*: insights into parthenogenetic reproduction. *Trends Ecol. Evol* 7:232–237. CrossRef, CSA
- ❖ Browne, R. A., M. Li, G. Wanigasekera, S. Simonek, D. Brownlee, G. Eiband, and J. Cowan. 1993. Ecological, physiological and genetic divergence of sexual and asexual (diploid and polyploid) brine shrimp (*Artemia*). *Trends in Ecology*
- ❖ Carmichael WW, Mahmood NA, Hyde EG (1990): Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). In *Marine Toxins: Origin, Structure, and Molecular Pharmacology*, eds. Hall S & Strichartz G, pp. 87-106. Washington, DC: American Chemical Society.
- ❖ CEE (2000). Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- ❖ Centeno MD, Brendonck L, Persoone G. (1993) Cyst-based toxicity tests. III: Development and standardisation of an acute toxicity test with the freshwater anostracan crustacean *Streptocephalus proboscideus*. In: *Progress in Standardization of Aquatic Toxicity Tests* (Soares AMVM, Calow P, eds). Boca Raton, FL: Lewis Publishers, pp 37-55.
- ❖ Cole, G. & R.J. Brown. 1967. The chemistry of *Artemia* habitats. *Ecology* 48: 858-861.
- ❖ Conklin, P.J. and Rao, K.R. (1982) Effects of two dithiocarbamates on the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*: molt-related toxicity and inhibition of limb regeneration. *Arch Environ Contam Toxicol* 11:431-435.
- ❖ Crawford, L. & Kocan, R.M. (1993) Steroidal alkaloid toxicity to fish embryos. *Toxicol. Lett.*, 66:175-81.
- ❖ Day JR, CA Hall, WM Kemp & A Yañez-Arancibia. 1989. *Estuarine ecology*, 558 pp. John Wiley & Sons, New York.

- ❖ Directiva 92/69/CEE de la Comisión, de 31 de julio de 1992. D.O. nº L383A/163-171.
- ❖ Ecotoxicological Testing for the Marine Environment. Vol 2 (Persoone G, Jaspers E, Claus C, eds). Bredene, Belgium:State University of Ghent and Institute for Marine Scientific Research, pp143-157.
- ❖ Environmental Health Center (1998) Coastal Challenges: A Guide to Coastal and Marine Issues. National Safety Council, Washington, 173 pp.
- ❖ Espiritu, E.Q., Janssen, C.R., 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.
- ❖ European Commission. Directive 98/15/EEC amending Council Directive 91/271/EEC, 1988. Urban wastewater treatment. Brussels; 1998. Off. J. of European Communities N° L 67/29–30 (7 March).
- ❖ Fan A, Howd R, Davis B. (1995) Risk assessment of environmental chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:341-368.
- ❖ Fawell, J.; Robinson, D.; Bull, R.; Birnbaum, L.; Boorman, G.; Butterworth, B.; Daniel, P.; Galal-Gorchev, H.; Hauchman, F.; Julkunen, P.; Klassen, C.; Krasner, S.; Orme-Zavaleta, J.; Reif, J. & Tardiff, R. (1997) Disinfection by-products in drinking water: critical issues in health effects research. *Environ. Health Perspect.*, 105:108-109
- ❖ Ferrando, M.D., Andreu-Moliner, E., 1991. Acute lethal toxicity of some pesticides to *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus plicatilis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 47:479-484.
- ❖ Gordo Muñoz MC y col. (1999): Presencia de microorganismos en las aguas prepotables y sus consecuencias: cianobacterias. XVIII Jornadas Técnicas de la Asociación España de Abastecimientos de Agua y Saneamiento. I: 301-315.

- ❖ Gupta S (1998): Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR. Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to vol. 2. Health criteria and other supporting information. Génova, Organización Mundial de la Salud. pp. 95-110
- ❖ Hawser SP, Codd GA, Capone DG, Carpenter EJ (1991): A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium*. *Toxicon*, 29:277-278.
- ❖ Heath, A.G.; Cech, J.J. Jr; Zinkl, J.G. & Steele, M.D. (1993) Sublethal effects of three pesticides on Japanese medaka. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 25: 485-91.
- ❖ Hedgecott, S., Delaney, P., Reynolds, P., 1997. Study to determine the toxicity of the virucidal disinfectant Virkon S to the waterflea (*Daphnia magna*), the earthworm (*Eisenia foetida*) and anaerobic sludge. Report to Antec International Ltd, Contract No. 09563-0.
- ❖ Helenius, A. & Simons, K. (1975) Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, 415: 29-79.
- ❖ Holcombe, G.W.; Benoit, D.A.; Hammermeister, D.E.; Leonard, E.N. & Johnson, R.D. (1995) Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 28: 287-97.
- ❖ Inman, C.B.E., Lockwood, A.P.M., 1977. Some effects of methylmercury and lindane on sodium regulation in the amphipod *Gammarus duebeni* during changes in the salinity of its medium. *Comp. Biochem. Physiol.* 58C:67-75.
- ❖ Kaur, K. and Dhawan, A. (1996) Variable sensitivity of *Cyprinus carpio* eggs, larvae and fry to pesticides. *Bull Environ Contam Toxicol* 50:593-599.
- ❖ Kaur, R.; Buckley, B.; Park, S.S.; Kim, Y.K. & Cooper, K.R. (1996) Toxicity test of Nanji Island landfill (Seoul, Korea) leachate using Japanese Medaka

- (*Oryzias latipes*) embryo larval assay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 57: 84-90.
- ❖ Kinnersley, D., 1990. Discharge consent and compliance policy: a blueprint for the future. NRA (National Rivers Authority) Water Quality Series vol. 1, Bristol, UK.
 - ❖ Liao, I.C., Guo, J.J., 1990. Studies on the tolerance of postlarvae of *Penaeus monodon*, *P. japonicus*, *P. semisulcatus*, *P. penicillatus*, *Metapenaeus ensis* and *Macrobrachium*. *Coa (Counc. Agric.) Fish. Ser.*, 24:95-99.
 - ❖ Mahmood NA and Carmichael WW (1986): Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon*, 24:175-186.
 - ❖ Matsunaga S, Moore RE, Miezcuzura WP, Carmichael WW (1989): Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *Journal of American Chemical Society*. 111: 8021-8023.
 - ❖ Matthews, R.S., 1995. *Artemia salina* as a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. *Free Radical Biol. Med.*, 18:919-922.
 - ❖ O.P.P. (Office of Pesticide Programs), 1995. Environmental Effects Database (EEDB) Environmental Fate and Effects Division, US EPA, Wasington, DC.
 - ❖ Paerl HW and David F Millie (1996): Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia*. Volume 35, 160-167.
 - ❖ Pardi, L. & Papi, F. (1961). Kinetic and tactic responses. In: TH Waterman, *The Physiology of Crustacea II*. Academic Press, New York. pp 365-399.
 - ❖ Persoone G, Jansen, CR. (1993) Freshwater invertebrate toxicity tests. In: *Handbook of Ecotoxicology*. Vol 1 (Calow P, ed). Oxford:Backwell Scientific, pp 51-65.

- ❖ Persoone, G. and Sorgeloost, P. (1980) The Brine Shrimp *Artemia* General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia* G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels, and E. Jaspers Universa Press Wetteren, Vol. 3, Belgium pp. 3-24.
- ❖ Persoone, G., Vanhaecke, P., 1981. Intercalibration exercise on a short-term standard toxicity test with *Artemia* nauplii. Final report. Contract EEC-ENV-396B(N), 30 p.
- ❖ Robillot C, Winh J, Puiseus-Dao S and Marie-Claire Hennion (2000): Hepatotoxin production kinetic of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as determined by HPLC- Mass Spectrometry and protein phosphatase bioassay. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3372-3378.
- ❖ 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.
- ❖ Schowanek, D., Fox, K., Holt, M., Schroeder, F. and Koch, V., 2001. GREAT-ER: a new tool for management and risk assessment of chemicals in river basin. *Water Sci. Technol.* 43:179–185.
- ❖ Sivonen K, Himberg K, Luukainen R, Niemela S, Poon GK and Codd GA (1989): Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacterial blooms and strains from Finland. *Toxicity Assessment*, 4:339-352.
- ❖ Snell TW, Persoone G. (1989a) Acute toxicity bioassays using rotifers. I: A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*. *Aquat Toxicol* 14:65-80.
- ❖ Snell TW, Persoone G. (1989b) Acute toxicity bioassays using rotifers. II: A freshwater test with *Brachionus rubens*. *Aquat Toxicol* 14:81-92.
- ❖ Smits, A.W.; Orgeig, S. & Daniels, C.B. (1994) Surfactant composition and function in lungs of air-breathing fishes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 266:R1309-R1313

- ❖ Sorgeloos, P., Remiche-Van der Wielen, C., Persoone, G., 1978. The use of *Artemia nauplii* for toxicity tests. A critical analysis. *Ecotox. Env. Safety*, 2:249-255.
- ❖ Sponza, D.T., 2003. Application of toxicity tests into discharges of the pulp-paper industry in Turkey. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54:74–86.
- ❖ UK Environment Agency. (1998). The determination of microcystin algal toxins in raw and treated waters by high performance liquid chromatography. In: Environment Agency, Methods for the examination of waters and associated materials.
- ❖ USEPA, 1991. Manual for the Evaluation of Laboratories Performing Aquatic Toxicity Tests. USEPA 600/4-90/031. 119 p.
- ❖ USEPA. 1999. Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual. EPA 815-R-99-014. 346 p.
- ❖ Utsunomiya, A., Watanuki, T., Matsushita, K., Tomita, I., 1997. Toxic effects of linear alkylbenzene sulfonate, quaternary alkylammonium chloride and their complexes on *Dunaliella* sp and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16:1247-1254.
- ❖ Vanhaecke P, Persoone G. (1984) The ARC test: a standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*. Methodology and evaluation. In: Carmichael WW (1994): The toxins of Cyanobacteria. Scientific American. 270(1), pp. 78-86.
- ❖ Ward-Booth, K. and M. Reiss (1988) *Artemia salina*: an easily culture invertebrate ideally suited for ecological studies, *Journal of Biological Education*, 22:247-251.
- ❖ http://www.bayersanidadanimal.com.mx/ipublish/data/files/Num_4UsosVirkonSenAcuicultura.pdf.
- ❖ www2.dupont.com/Crop_Protection/.../Virkon_SDS_210706.pdf(2007).
- ❖ <http://eprints.ucm.es/7163/>