



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS  
DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA**

**TESIS**

**“VALORACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA INDUCIDA POR UNA MEZCLA DE  
COMPUESTOS PEROXIDADOS, TENSOACTIVOS Y ÁCIDOS ORGÁNICOS EN FORMA DE  
POLVO SOLUBLE EN AGUA: EXPOSICIONES SOBRE LARVAS DE ARTEMIA”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO – FARMACOBIOLOGA**

**SUSTENTANTE:**

**P.Q.F.B. MARÍA GALVÁN DUQUE**

**ASESOR DE TESIS:**

**M.C. MA. CARMEN BARTOLOMÉ CAMACHO**

**MORELIA, MICHOACÁN, OCTUBRE DE 2011**

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

## ÍNDICE

<b>I.- LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>II.- JUSTIFICACIÓN</b> .....	2
<b>III.- HIPOTESIS DE PARTIDA</b> .....	3
<b>IV.- RESUMEN</b> .....	4
<b>V.- INTRODUCCIÓN</b> .....	6
V.1.- ESTADO ACTUAL DE CONTAMINACION DE AGUAS MARINAS ....	6
V.2.- BIOCIDAS .....	7
V.3.- ALDEHIDOS .....	10
V.4.- ALCOHOLES .....	10
V.5.- COMPUESTOS DE AMONIO CUATERNARIO .....	11
V.6.- METALES PESADOS .....	12
V.7.- COMPUESTOS FENOLICOS .....	13
V.8.- PERÓXIDOS/DONANTES DE OXÍGENO .....	14
V.9.- DERIVADOS HALOGENADOS: YODO, CLORO Y BROMO .....	15
V.10.- DESINFECTANTES Y RIESGO AMBIENTAL.....	16
V.11.- PELIGROSIDAD DE LOS VERTIDOS DE AGUAS CONTAMINADAS .....	21
V.12.- UTILIZACIÓN DE INVERTEBRADOS ACUÁTICOS EN INVESTIGACION ECOTOXICOLOGICA .....	22
V.13.- BIOINDICADOR ARTEMIA FRANCISCANA .....	24
V.14.- ARTEMIA FRANCISCANA .....	25
V.14.1.- Anatomía externa .....	26
V.14.2.- Anatomía interna .....	31
V.15.- RELEVANCIA MEDIOAMBIENTAL DE LOS ESTUARIOS .....	46
V.15.1.- Relevancia de la Artemia franciscana en los estudios ecotoxicológicos en ambientes de agua salada .....	47
<b>VI.- OBJETIVOS GENERALES</b> .....	48
<b>VII.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	48
<b>VIII.- MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	49

VIII.1.- COMPUESTO QUIMICO UTILIZADO.....	49
VIII.2.- AGUA MARINA SINTETICA .....	50
VIII.3.- OBTENCION DE ARTEMIA FRANCISCANA .....	51
VIII.4.- ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA: LETALIDAD .....	53
VIII.4.1.Distribucion de larvas de artemia.....	53
VIII.5.- EXPOSICION DE LAS LARVAS AL BIOCIDA .....	53
VIII.5.1.- Exposiciones previas .....	53
VIII.5.2.- Exposiciones finales.....	55
VIII.5.3.- Expresión de los resultados .....	56
<b>IX.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>56</b>
<b>X.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>XI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>

# VALORACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA INDUCIDA POR UNA MEZCLA DE COMPUESTOS PEROXIDADOS TENSOACTIVOS Y ÁCIDOS ORGÁNICOS EN FORMA DE POLVO SOLUBLE EN AGUA: EXPOSICIONES SOBRE LARVAS DE ARTEMIA.

## I.-LISTA DE ABREVIATURAS

- IPCS: Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas.
- CL<sub>50</sub>: Concentración Letal 50.
- CE<sub>50</sub>: Concentración Efectiva 50.
- CL<sub>min</sub>: Concentración Letal Mínima.
- CL<sub>max</sub>: 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.
- OPP: Office of Pesticide Programs.

## 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 del uso de sustancias químicas, de forma particular los desinfectantes, estos permiten una mejora en la obtención de rendimientos mediante diferentes procesos englobados en actividades como son la desalación y la acuicultura. La desinfección, es una práctica importante dentro de las actividades anteriores, siendo necesaria para la protección de la salud pública, al reducir considerablemente el número de afecciones debidas a la presencia microbiana (Fawell y col., 1997). Sin embargo, el uso de estos desinfectantes implica un grave riesgo sobre la fauna acuática, cuando dichos compuestos son vertidos al medio acuático posteriormente a su uso (Boorman y col., 1999). Toda una sistemática de actuación mediante ensayos toxicológicos ha permitido la conformación de una severa vigilancia que intenta preservar a los ecosistemas acuáticos de daños y efectos adversos derivados de los contaminantes. Se han ido determinando diferentes modelos para el estudio de la toxicidad y 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, el uso de la *Artemia* en agua salada o su equivalente, la *Daphnia* en agua dulce ha sido ampliamente utilizado para estudios de toxicidad aguda y crónica, tanto en su estado embrionario como en sus formas larvianas, presentándose como organismos biosensores de gran utilidad para estudios de toxicidad en organismos acuáticos. En los últimos años, multitud de estudios ecotoxicológicos, acerca de la susceptibilidad de diferentes formas larvianas 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, (Crawford y Kocan, 1993; Heath y col., 1993; Holcombe y col., 1995; Kaur y col., 1996). Es por ello que en este trabajo hemos utilizado a la *Artemia* como bioindicador de ambientes salinos, 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.

### **III.- HIPÓTESIS DE PARTIDA**

El desarrollo de la presente tesis está basado en la hipótesis inicial del riesgo medioambiental provocado por la posible presencia de sustancias

químicas, y en particular de desinfectantes, procedentes de los procesos de desalación y acuicultura que puedan hacerse presentes en cursos de aguas superficiales, lagos naturales y artificiales, y zonas de estuario. Estas sustancias químicas 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 franciscana* 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 e incluso virucidas, es decir, que eliminan microorganismos patógenos. Existen diferentes formulados que vienen siendo utilizados para la limpieza y desinfección de materiales, entre ellos se encuentra un sistema sinérgico, balanceado y estabilizado de compuestos peroxigenados, surfactantes y ácidos orgánicos, objeto de nuestro estudio, el cual 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. Los ingredientes activos técnicos presentes en el compuesto, así como su concentración, son potasio monoperoxisulfato (49.4 %), ácido sulfámico (4.4 %) y ácido málico (8.9 %). (Hedgecote y col., 1997).

Aunque el uso 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 y Kuhn, 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) proponen limitar las emisiones de contaminantes en agua residuales para todas las naciones. 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 sobre larvas de *Artemia franciscana*, 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 quedó estandarizada como una prueba en ecotoxicología marina, basado en la obtención de la CL<sub>50</sub> sobre nauplios *Artemia salina* (ARC-test), y desde entonces los resultados obtenidos han sido calificados como satisfactorios (Persoone y Vanhaecke, 1981).

El propósito de este trabajo fué 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**

### **V.1.- Estado actual de la contaminación de aguas marinas**

Durante siglos el océano ha podido soportar la contaminación natural y actuación de la sociedad humana sin sufrir grandes modificaciones, pero desde 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 radioactivas, 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, 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 y 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 en los organismos 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 para orientarse en el espacio (Helenius y Simons, 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.2.- Biocidas**

Se conoce con el nombre de biocidas a 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 característica de ser letales para los microorganismos bajo cierta conjunción de circunstancias, que hacen que los biocidas sean viables para su comercialización (Boorman y col., 1999).

Por definición cualquier biocida resultará eficaz, dependiendo de la concentración a la que será usado 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 eficaz.

Así, la búsqueda de un equilibrio entre las limitaciones y los atributos que le hacen eficaz y seguro a un biocida, es el desafío constante a la hora de elegirlo. De esta forma, puede llegar a ser necesario el planteamiento de necesidades de tiempos limitados de acción 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 (Environmental 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 antimicrobiana 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 del uso masivo de biocidas que podrían considerarse como tradicionales, y que ha provocado que las empresas que los comercializan se atrincheren en sus propuestas en esperada 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 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, 1995).

### **V.3.-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. 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. 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 y col., 1999).

### **V.4.-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. 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 %. Sin embargo, 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 y col., 1999).

El mecanismo de acción es la desnaturalización de proteínas; principalmente a nivel de membrana celular y también a nivel citoplasmático. Por lo que puede hacer disrupción de la membrana celular o alteración de la función de una proteína citoplasmática (es decir, una enzima); o bien un daño meramente estructural, que tienden a producir la muerte de estos m.o.

## **V.5.- Compuestos de Amonio Cuaternario**

Genéricamente denominados como QUATs, son compuestos solubles en agua, de amplio uso 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. Si bien su eficacia es limitada debido a que son inactivados por cationes (ej. aluminio, sodio), materiales orgánicos y otros detergentes, 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 (Boorman y col., 1999).

## **V.6.-Metales Pesados**

Casi todos los metales pesados son tóxicos para la mayoría de las formas de vida, y esta característica ha sido aprovechada tradicionalmente para su uso como desinfectantes. Así, compuestos como el zinc, plata, mercurio, arsénico, cobre, boro o estaño han ido incorporándose de diferente manera a los formulados, cada vez con mayor grado de sofisticación. A menudo se utilizan sales cúpricas como alguicidas, 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, 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 amplio uso se vea progresivamente cuestionado, ya que, aunque son compuestos baratos y eficaces, su alta toxicidad y gran persistencia en el medioambiente hacen de ellos sustancias peligrosas, lo que ha promovido movimientos sociales para prohibir su uso en muchas aplicaciones. Además, existen bacterias que desarrollan resistencia 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 y col., 1999).

## **V.7.-Compuestos Fenólicos**

El uso de compuestos fenólicos como desinfectantes proviene de principios de siglo, cuando estaba vigente la aplicación de productos derivados del pino y alquitrán de hulla, su uso llegó a ser tal que el fenol fue utilizado como patrón para medir la eficacia antimicrobiana, pese a conocer las características carcinógenas de él. 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 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 amplio uso hasta que sus propiedades neurotóxicas fueron reconocidas, prohibiéndose por la FDA. Estos compuestos son de uso corriente, usándose a concentraciones de 500-1000 ppm, normalmente mediante mezclas con alcoholes como desinfectantes hospitalarios. Tienen un olor característico y son capaces de degradar plásticos y otras superficies, pero pueden mezclarse con aldehídos para hacer los denominados *esporocidas de alto nivel*. Aquellos que abarcan un amplio espectro de acción poseen características tóxicas, además de poseer la capacidad de interactuar con compuestos orgánicos en medios acuáticos y su gran persistencia medioambiental, de tal forma que 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 y col., 1999).

## **V.8.- 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 corta en su forma de aplicación a concentraciones del 3 %, o 30, 000 ppm. Cuando se intentó aplicar a concentraciones del 35 % resultó ser altamente corrosivo, se evapora rápidamente y tiene propiedades carcinógenas. Su uso como agente blanqueador y decolorante para la mayoría de tejidos y polímeros está 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 existe 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 uso. El gas ozono se utiliza como desinfectante de aguas, tanto de uso recreativo como para agua potable. Es eficaz contra toda forma de microorganismos, incluso contra esporas y parásitos del género *Cryptosporidium*. Sin embargo, resulta ser un potente tóxico, con una vida media 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 cumplir requisitos estrictos de cara a la exposición de los manipuladores de esta sustancia (Boorman y col., 1999).

## **V.9.- 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.

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 corta, y para que el formulado tenga efecto debe ser preparado *in situ* justo antes de su uso. Por otra parte, es altamente corrosivo para metales, caucho, plásticos, etc., y sus vapores pueden ser letales. Se han venido comercializando mezclas con estabilizadores para solventar este problema, pero son 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 el uso 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 y col., 1999).

## **V.10.-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 uso incluyen,

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 y col.,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 se 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 medio ambiente, 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 el uso 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, DL<sub>50</sub> (dosis letal 50), CL<sub>50</sub> (concentración letal 50), CE<sub>50</sub> (concentración eficaz 50), CI<sub>50</sub> (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 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 directivas de las comisiones de la CEE y de los EEUU, por la que se fijan los principios de evaluación del riesgo, para el ser humano y el medio ambiente. 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 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 y col., 1999).



## ***V.11.-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, poseen alguna de las siguientes características:

### **➤ PROPIEDADES INFLAMABLES**

Si es un líquido con punto de ebullición menor de 140 °F (60 °C).

Si es capaz, a temperatura y presión ambiente, de producir ignición a través de fricción, absorción o por cambios químicos espontáneos.

Si es un gas comprimido inflamable.

Si es un oxidante.

### **➤ PROPIEDADES CORROSIVAS**

Si en estado líquido tiene un pH igual o menor de 2, o igual o mayor de 12.5.

Si es un líquido que corroe el acero.

### **➤ PROPIEDADES REACTANTES**

Si es normalmente inestable o por cambios que provoquen 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”.

## **V.12.-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 mecanísticos 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 el 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 a la identificación del riesgo, la valoración del cociente concentración-efecto, la valoración de la exposición y finalmente la caracterización del riesgo (Fany col., 1995), y es precisamente en estos términos donde los invertebrados han demostrado ser una herramienta fundamental, 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's, 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 y Persoone, 1984; Snell y Persoone, 1989a) y otros dos de agua dulce (Snell y Persoone, 1989b; Centeno y Col., 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 y Jansen, 1993).

### **V.13.-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 y col., 1993).

Los anostracos son braquiópodos que no presentan caparazón y en muchas de sus formas se parecen a los crustáceos primitivos. El grupo es reducido e incluye a camarones de aguas salinas, su cuerpo es alargado y existe una pequeña especialización de segmentos y apéndices. El corazón es

un tubo dorsal a lo largo del cuerpo. El cuerpo presenta una cavidad, el hemocele. Su aparato reproductor derivado del tubo celómico, presentando sexos separados y órganos sexuales pares. El aparato excretor se localiza en las glándulas coxales derivadas de rudimentos del celoma, el intestino tiene forma de *J*, muchos se alimentan de comida en suspensión o de desechos del lecho acuático. Los apéndices son anchos y planos, los filópodos muy parecidos a los de los primitivos crustáceos y en ellos vemos las branquias. 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 y Brown, 1967).

#### **V.14.- 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

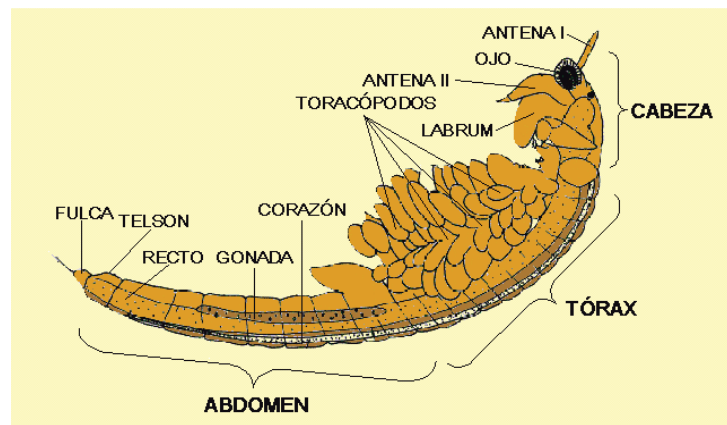
del año. La *Artemia franciscana* es la más común de las especies y una de las más utilizadas como bioindicadores, (Persoone ySorgeloost, 1980).

#### **V.14.1.- 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 crustáceos primitivos. 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 nefridióporos. El aparato excretor del adulto está compuesto de dos glándulas maxilares, o glándulas coxales, se localizan en el segmento de la segunda maxila donde forman un acúmulo 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 nefridióporos. 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 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

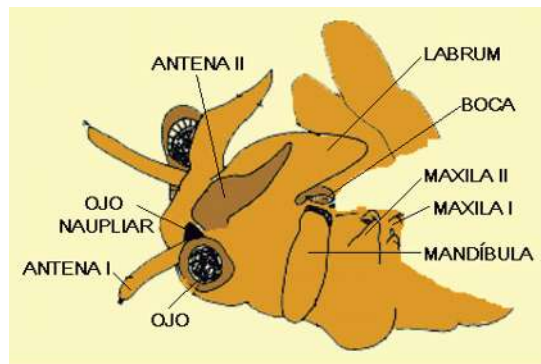
protopodio, los procesos laterales son los éxitos, los mediales los énditos. Cinco o seis énditos se extienden hacia el margen medial del protopodio y son extremadamente pequeños, los proximales y distales al ser un poco mayores pueden verse con facilidad, sobre los énditos, en dirección medial se localizan 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 y Reiss 1988).



**Figura V.14.1.1** Esquema de la anatomía de una hembra de *Artemia franciscana*.

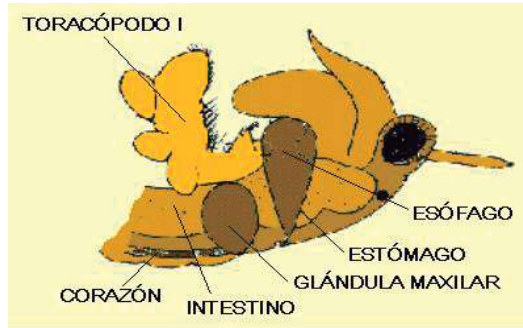


La mayoría de los anostracos se alimentan de comida en suspensión, aunque hay unos pocos que son carnívoros. Un surco longitudinal y medioventral se utiliza para la alimentación, aparece entre la gnatobase y los filópodos. La boca se ve en la cara anterior del final del surco. Los movimientos natatorios 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 y Reiss, 1988).



**Figura V.14.1.2** 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 y Reiss, 1988).



**Figura V.14.1.3** 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 y Reiss, 1988).



**Figura V.14.1.4** Tórax posterior y abdomen de una hembra de *Artemia franciscana*

## **V.14.2.- 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 hemocele, bañado en sangre y muchos de los materiales atraviesan su fina pared. Al intestino se une un corto recto, localizado en el cuarto segmento del abdomen, es el responsable de la formación de bolitas fecales y se abre al exterior a través del ano el cual se encuentra entre las furcas caudales y está provisto de un esfínter (Cole yBrown, 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 hemocele cuyo espacio se extiende por los tejidos del animal, el corazón no presenta claros movimientos peristálticos pero sí se

observa una contracción simultánea en todo él. Se pueden observar corpúsculos en el flujo de sangre, tienden a moverse posteriormente en el seno pericardial, cuando se cierra se observa su paso 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 y 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 y 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 nefridióporo 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 ultra filtrar la sangre en el interior del *lumen* de este fondo de saco; este ultra filtrado se va modificando según baja por el conducto hacia el exterior. La artemia es un eficiente

osmorregulador y soporta importantes rangos de salinidad (Cole y Brown 1967).

##### *5.- Sistema reproductivo*

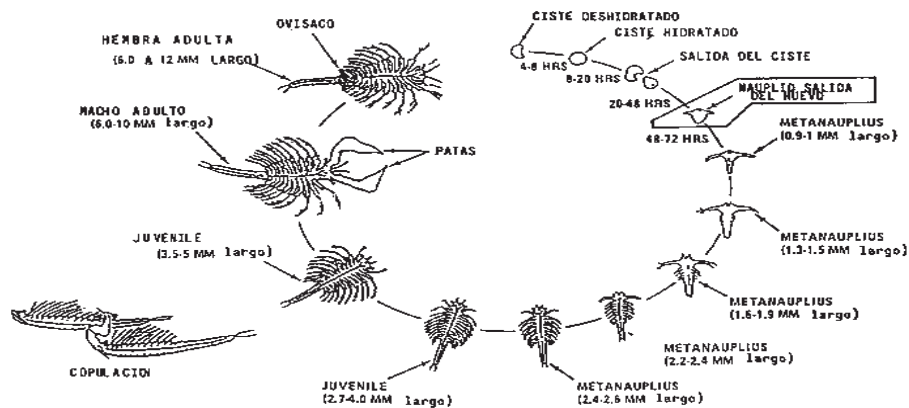
Las gónadas son dos pares de tubos localizados dorso-lateralmente en la parte posterior del tórax y anterior del abdomen. Durante el apareamiento el macho se aproxima a la cara dorsal de la hembra y se cuelga de ella con su larga segunda antena; el macho gira su cuerpo alrededor de la hembra, inserta 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 y col., 1993).

##### *6.- Comportamiento de la Artemia*

Las artemias adultas nadan constantemente usando los filópodos de los apéndices torácicos. El agua en forma de ondas atraviesa la serie de filópodos y las partículas de comida pasan al surco alimenticio, y se crea un efectivo con el movimiento de natación de las setas. Por tanto, la locomoción y la natación son simultáneas. La artemia también se alimenta escarbando en algas de superficies duras. Los anostracos pueden originar rápidos movimientos por la flexibilidad de su abdomen a lo que ayuda la seta plumosa con función natatoria (Pardi y Papi, 1961).

Las artemias presentan tres ojos, es sensible a la luz y da 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 experimentales donde la luz procede de otros puntos esta posición cambia (Pardi y Papi, 1961).

#### 6.- Ciclo Vital



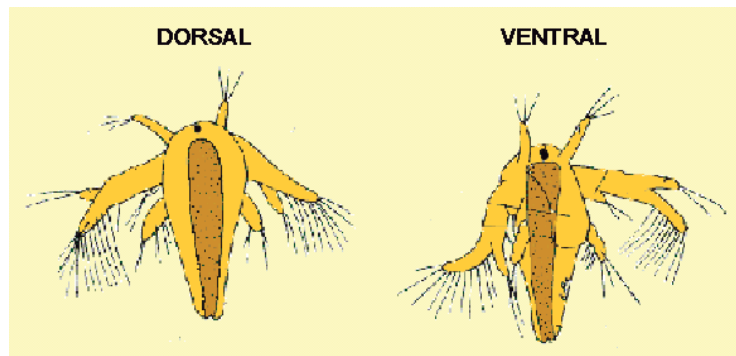
**Figura V.14.2.6.1** Ciclo vital de la Artemia franciscana.

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 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, 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 aproximadamente 350  $\mu\text{m}$ , 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. Posee un único ocelo, también denominado ojo naupliar, negro o rojo en la cabeza entre el primer par de antenas (Anderson, 1967).



**Figura V.14.2.6.1.1** Vista dorsal y ventral de un nauplio de *Artemia franciscana*

El cerebro puede ser visible alrededor del ojo de los adultos y a ambos lados de los ojos se levantan dos anténulas 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 esta etapa 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, 1967).

## 6.2 Periodo de metanauplio

Se trata de una larva pequeña transparente con un tronco largo; 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 aun 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 al recto, el cual se abre al exterior a través del ano, al final del telson. Los ojos sésiles aparecen en posición lateral, pero requerirán aún varias mudas para alcanzar su verdadero estado final (Anderson, 1967).

#### 6.2.1 Larva 2

Difiere en unos pocos caracteres al 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, 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 engrosa, 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, 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, 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 toracópodos II y a veces III muestran un comienzo de articulación (Anderson, 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, 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 dichas extremidades. Las mandíbulas disminuyen su talla, las maxílula 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, 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, 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, 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, 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, 1967).

#### 6.3.6 Larva 11

Las antenas dejan de tener función locomotora y de filtración, las mandíbulas son extremidades rudimentarias según se va 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, 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, 1967).

#### 6.4 Periodo postlarval

Comprende cinco estadios donde se desarrollan las antenas y las estructuras genitales principalmente (Anderson, 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 ventrolateral y las cerdas terminales se reducen. El brote del pene y el rudimentario saco ovárico se agrandan (Anderson, 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, 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, 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, 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

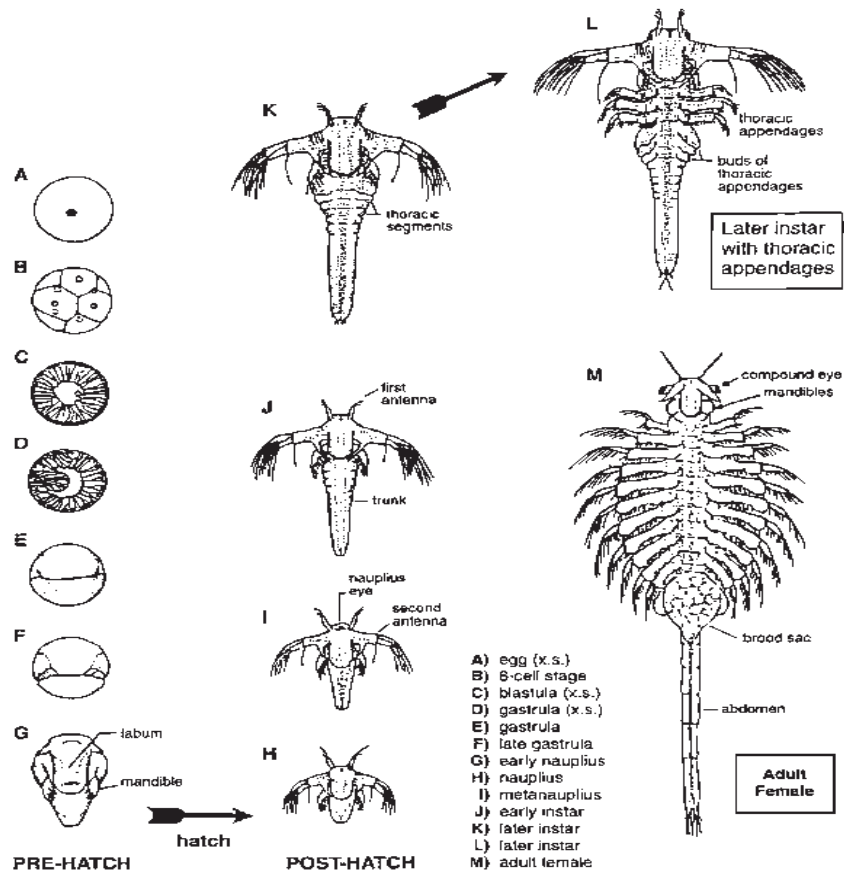
de pinzas, el muñón frontal desarrolla espinas ramificadas o no y se agranda, estas espinas pueden ser solitarias o ir en pareja. Algunos a nivel lateral sobre las extremidades pueden mostrar tejido remanente de las mandíbulas. Los genitales se expanden, los sacos ováricos forman una espina y una especie 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 parternogénicas. 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 preternogénicas ésto no ocurre y el desarrollo



embrionario comienza tan pronto como los huevos han llegado al útero (Browne, 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 y col., 1993).

## **Artemia Development from Egg to Adult Stages**



**Figura V.14.6.4.5.1** Etapas de maduración de la Artemia.

### **V.15.- 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 y col., 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.15.1- 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, 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 uso (Conklin y Rao, 1982; Kaur y col., 1996; Barahona y col., 1994; Sánchez-Fortún y col., 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.- OBJETIVO GENERAL**

El estudio de letalidad como método de detección rápida y temprana, en larvas de *Artemiafranciscana* como modelo biosensor 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 franciscana* 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 éste 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

## **VIII.- MATERIAL Y MÉTODO**

### **VIII.1.-Compuesto químico utilizado**

Se realizó una mezcla de diferentes sustancias químicas seleccionadas después de una rigurosa revisión de las más utilizadas en mezclas, en función de su capacidad como desinfectante para los problemas usuales en las plantas desaladoras, producción acuícola y la desinfección de materiales.

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.

Los compuestos químicos presentes en el desinfectante, así como su concentración, son los siguientes:

- |                              |         |
|------------------------------|---------|
| - Potasio monoperoxisulfato: | 49.4 %. |
| - Ácido sulfámico            | 4.4 %.  |
| - Ácido Málico               | 8.9. %. |

Aplicaciones: en general puede ser utilizado 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.

### ***VIII.2.-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 salicilatos, y lleva adicionados quelatos especiales que

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

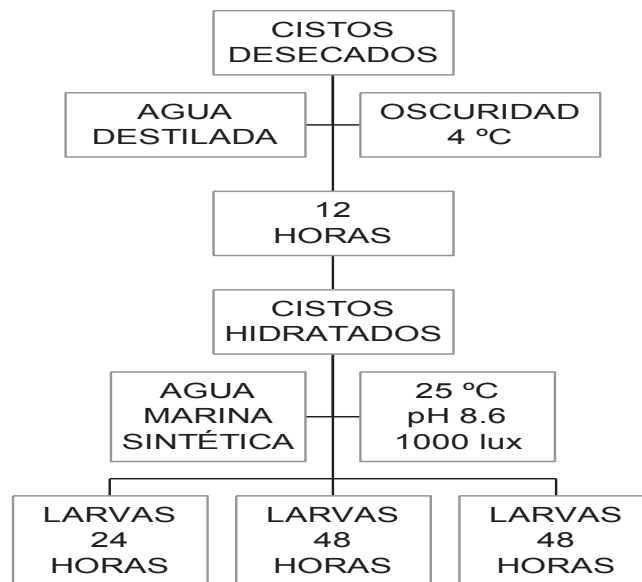
### **VIII.3.-Obtención de *Artemia franciscana***

La obtención de larvas de *Artemia franciscana* se realizó 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 mínimo ( $T_0$ ) 9 horas y máximo ( $T_{90}$ ) 16 horas, obteniendo poblaciones homogéneas de nauplios, de las que al menos un 80 % tuvieron un tamaño de 500-525  $\mu\text{m}$ . La técnica aplicada está basada en la metodología propuesta por Persoone y col. (1989), con modificaciones planteadas con posterioridad a la metodología original (Barahona y col., 1994; Sánchez-Fortún y col., 1995)

Los huevos desecados fueron hidratados en placas de Petri mediante inmersión en agua destilada a una temperatura de 4°C, manteniéndolos así por 12 horas en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, los huevos flotantes se desecharon, y el resto se transfirieron a una probeta de decantación que contenía agua marina reconstituída a 25°C y pH de 8.6, y al que se le aplicó

una fuente de luz de aproximadamente 1000 Lux. A dicho medio, conteniendo los huevos hidratados, se le mantuvo con burbujeo continuo, con el fin de facilitar su eclosión.

Bajo estas condiciones, al cabo de 16-18 horas comenzó la eclosión de los huevos, y transcurridas 20 horas desde que los huevos fueron incubados en el medio salino reconstituido se obtuvo una amplia población de nauplios libres. Dichos nauplios fueron transferidos a placas Petri con medio salino reconstituido, a 25°C y aireación. Bajo estas condiciones, los nauplios se mantuvieron hasta alcanzar las 24 horas de vida, los cuales se utilizaron para las pruebas de toxicidad.



**Figura VIII.3.1** Esquema de la obtención de larvas de *Artemia* a partir de cistos deshidratados (Nota: este trabajo se realizó en estadíos de 24 horas).



## **VIII.4.-Estudios de Toxicidad Aguda: Letalidad**

### ***VIII.4.1.-Distribución de larvas de Artemia***

Las larvas de *Artemia* obtenidas, según los estadios 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.

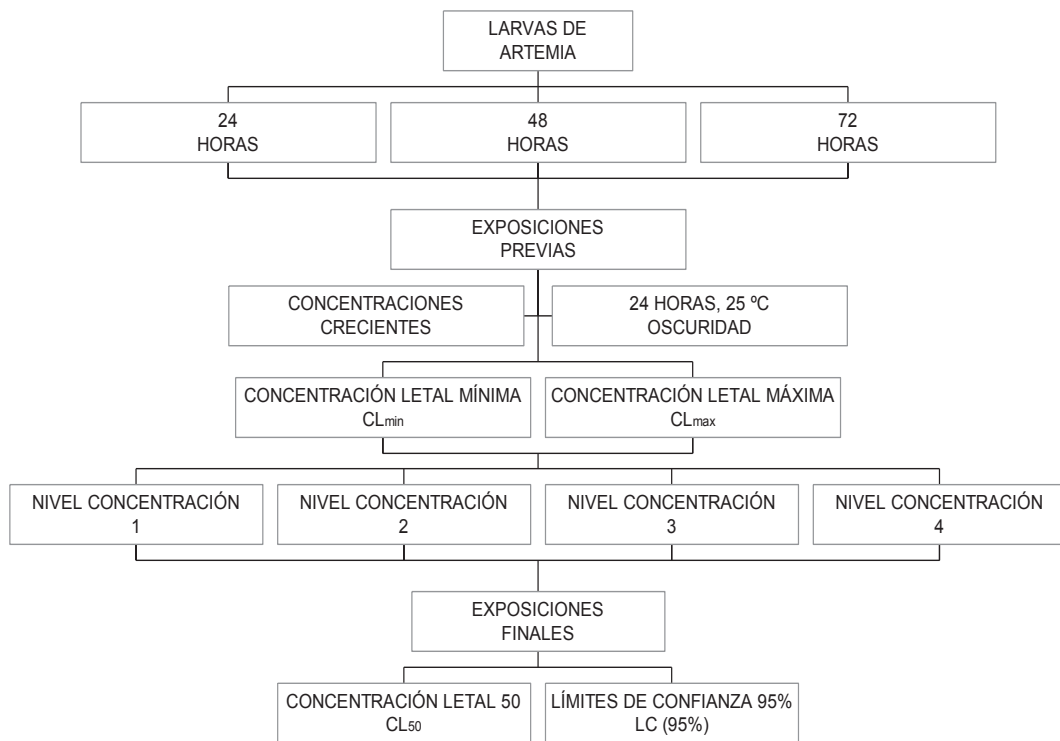
Para ello, un conjunto de larvas procedentes del total de larvas obtenidas fueron separadas del resto y se transfirieron a una nueva placa Petri, teniendo cuidado de traspasar el menor volumen de medio salino posible. Seguido a esto, y por medio de una pipeta Pasteur, un conjunto de 10 larvas se introdujeron en cada uno de los pocillos, realizandobajo lupa una confirmación posterior a su traslado, para asegurar que cada pocillo poseía el número exacto de larvas.

### ***VIII.5.-Exposición de las larvas al biocida***

#### ***VIII.5.1.- Exposiciones previas***

Con el biocida en cuestión 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 se incubaron a 25°C en una cámara de cultivo, en ambiente de oscuridad y durante un periodo de 24 horas. Pasado este tiempo, se realizó 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 consideró que una larva estaba muerta cuando no exhibía ningún tipo de movimiento durante un periodo de observación de 10 segundos.



**Figura VIII.5.1.1** Esquema de la realización de los ensayos de letalidad con larvas de *Artemia* (Nota: sólo de 24 horas)

Para la validación de los ensayos realizados, fue 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 (24 horas 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, quedaron establecidos los rangos de concentración que posteriormente se aplicaron para los diferentes ensayos de toxicidad aguda.

#### ***VIII.5.2.- Exposiciones finales***

Una vez determinadas la  $CL_{min}$  y  $CL_{max}$ , se practicó la correspondiente exposición al biocida sobre el 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 la mezcla desinfectante.

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

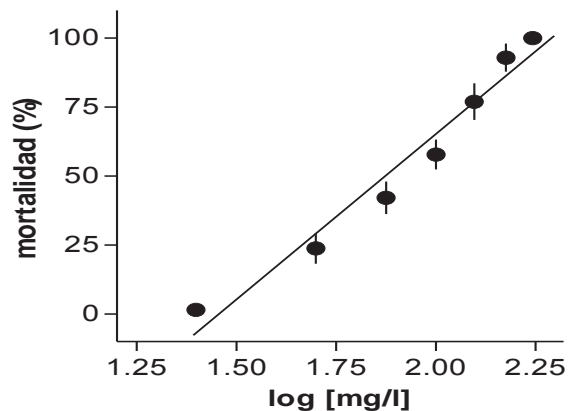
### **VIII.5.3.-Expresión de los Resultados**

La letalidad es expresada como Concentración Letal 50 (CL<sub>50</sub>) 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 dilución 1:100 provocaron la muerte de todos los nauplios de *Artemia franciscana*. 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<sub>50</sub> de 81.8 (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 IX.1.



**Figura IX.1.** Análisis de regresión lineal correspondiente a los porcentajes de letalidad sobre larvas de *Artemia* obtenidos a las 24 horas de exposición de la mezcla desinfectante.

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 al hipoclorito de calcio. 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 en este estudio. 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 cómo los valores de toxicidad en organismos acuáticos están influenciados por el grado de salinidad del medio, y cómo 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 desinfectante hipoclorito de calcio 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 el desinfectante utilizado en el presente estudio 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<sub>50</sub> entre 1.99-2.52 mg/L (Espíritu y col., 1995). Por el contrario, las larvas de *Artemia* han

resultado ser más sensibles a hipoclorito de calcio 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 produjo 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

(Hedgecote 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 el experimento 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 tensoactivo de la sustancia problema. El grado de dificultad respiratoria obtenido en estos ensayos es similar al observado por otros autores (Smits 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 y Simons, 1975) podrían ser un elemento determinante a la hora de valorar este efecto adverso observado.

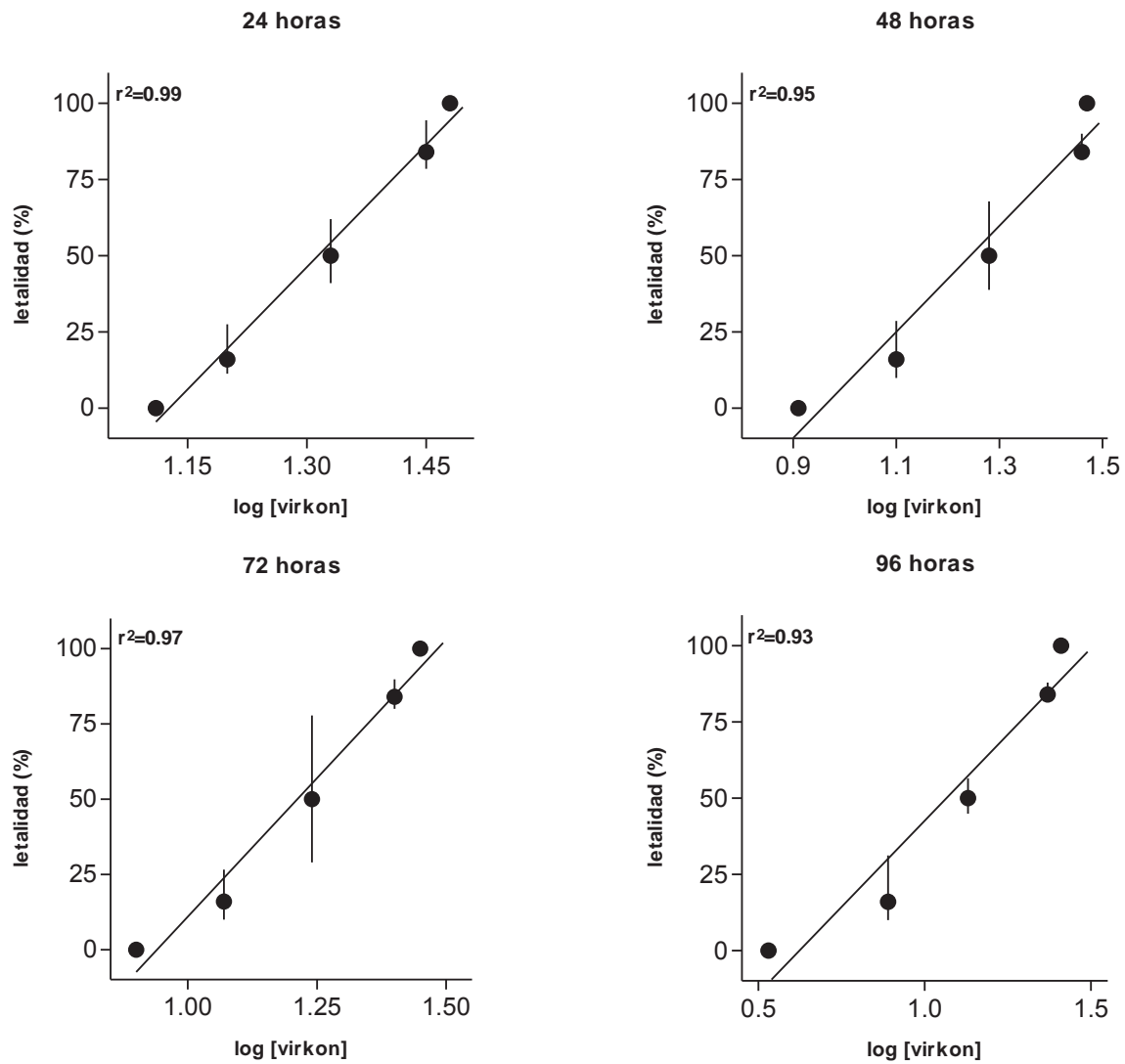
Los resultados obtenidos en el trabajo indican que el desinfectante en cuestión presenta una baja toxicidad aguda para peces, y puede ser clasificado como sustancia poco tóxica (según clasificación ecotoxicológica de



EPA) en su exposición medioambiental acuática sobre alevines de medaka (*Oryzias latipes*). (Bartolomé y Sánchez Fortún, 2006) al igual que ocurre con los resultados obtenidos en este trabajo.

COMPUESTO	N	CL <sub>50</sub> (LC 95 %)			
		(mg/l)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
potasio					
monoperoxisulfato					
(49.4 %),					
ácido sulfámico		21.2	18.96	17.38	13.43
(4.4 %)	4				
		(17.79-25.25)	(15.78-22.78)	(14.72-20.52)	(11.02-16.36)
ácido málico					
(8.9%)					

**Tabla1.** Valores de concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), con sus correspondientes límites de confianza al 95% (LC 95%), obtenidos mediante la exposición a la mezcla de desinfectante de alevines de medaka (*Oryzias latipes*), a diferentes tiempos de exposición



**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 desinfectante.

## X.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que la presencia del compuesto desinfectante, 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 franciscana* 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 Scientarium Socialium 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.
- ❖ 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. 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*
- ❖ 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.

- ❖ 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.
- ❖ 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.
- ❖ 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, 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.
- ❖ 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.
- ❖ 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.

- ❖ 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. and Vanhaecke, P., 1981. Intercalibration exercise on a short-term standard toxicity test with *Artemia* nauplii. Final report. Contract EEC-ENV-396B(N), 30 p.
  
- ❖ 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.
  
- ❖ 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., Rémiche-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.
- ❖ USEPA, 1991. Manual for the Evaluation of Laboratories Performing Aquatic Toxicity Tests. USEPA 600/490/031. 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](http://www.bayersanidadanimal.com.mx/ipublish/data/files/Num_4UsosVirkonSenAcuicultura.pdf).
- ❖ [www2.dupont.com/Crop\\_Protection/.../Virkon\\_SDS\\_210706.pdf](http://www2.dupont.com/Crop_Protection/.../Virkon_SDS_210706.pdf)(2007).
- ❖ <http://eprints.ucm.es/7163/>